

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Культура животных клеток

Методы

П. А. МАНУСОВ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

ANIMAL CELL CULTURE

A PRACTICAL APPROACH

Edited by R. I. Freshney

Cancer Research Campaign, Department of Oncology,
University of Glasgow, 1 Horselethill Road,
Glasgow, G12 9LX, UK

IRL Press
Oxford • Washington DC

Культура животных клеток

Методы

Под редакцией

Р. ФРЕШНИ

Перевод с английского

канд. биол. наук **М. А. ПАНОВА**



Москва «Мир» 1989

ББК 28.05

К90

УДК 576.3

Авторы: Конки Д., Эрба Э., Фрешни Р., Гриффитс Б.,
Хэй Р., Ласнитски И., Маурер Г., Мораска Л., Вилсон Э.

**Культура животных клеток. Методы: Пер. с англ./Под
К90 ред. Р. Фрешни. — М.: Мир, 1989. — 333 с., ил.
ISBN 5-03-000359-2**

Книга коллектива авторов из Великобритании, Италии, ФРГ и США — современное практическое руководство по культивированию животных клеток и тканей. Представлены новейшие разработки в этой области, актуальные для различных направлений экспериментальной биологии и медицины.

Для молекулярных биологов, биохимиков, цитологов и других специалистов, использующих метод культуры клеток и тканей.

К $\frac{2001020000-157}{041(01)-89}$ 129—88, ч. 1

ББК 28.05

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-000359-2 (русск.)

ISBN 0-947946-62-4 (англ.)

© 1986 IRL Press Limited

© перевод на русский язык,
«Мир», 1989

Методы культуры ткани получили в последнее время чрезвычайно широкое распространение практически во всех областях современной биологии. Трудно представить себе молекулярно-биологическую лабораторию или современное биотехнологическое предприятие, где не использовались бы тканевые культуры. Поэтому предлагаемый читателю сборник должен стать настольным пособием как для молекулярных биологов, так и для специалистов-биотехнологов.

Разделы сборника, посвященные методам элютриации и проточной цитометрии, заинтересуют в первую очередь исследователей, работающих в области молекулярной биологии клетки. Эти два новых метода хотя и требуют дорогостоящего оборудования, но зато позволяют получать принципиально новые результаты. При чтении главы о проточной цитометрии особое внимание следует обратить на возможные сферы применения этого метода: сравнительный анализ ответов индивидуальных клеток на те или иные воздействия и отбор индивидуальных клеточных популяций, идентичных по тому или иному параметру. В настоящее время, когда появляется все больше данных о гетерогенности клеток в тканях и даже в клеточных культурах, использование проточной цитометрии в сочетании с современными методами клонирования клеток сулит весьма увлекательные перспективы.

Особое внимание привлекает раздел, посвященный методу органных культур. Еще на ранних этапах работы с культурами клеток в монослое было отмечено, что характер ответа клетки на то или иное воздействие в значительной степени зависит от наличия межклеточных коммуникаций. Их изучение в культуре клеток привело к развитию представления о метаболической кооперации клеток, и это представление нельзя игнорировать при изучении формирования клеточных ответов на внешние воздействия. Органная культура обеспечивает исследователя пространственными трехмерными клеточными моделями, наиболее приближающимися к тканевым структурам. Таким образом, органная культура представляет собой наиболее «физиологичную» клеточную систему, доступную для широкого круга экспериментальных исследований. В разделе, посвященном

методу гибридизации *in situ* для выявления индивидуальных клеточных РНК, приведены результаты лишь начальных исследований в этой области. Регистрация ответов индивидуальных клеток с помощью этого метода позволит расширить использование органных культур в биологических исследованиях.

Предлагаемый читателю сборник не охватывает, конечно, всех методов культивирования клеток и тканей. Исследователи, только приступающие к работе с культурами, могут обратиться к таким руководствам, как, например, С. Перт «Основы культивирования микроорганизмов и тканей» (М. Мир, 1978), Р. Адамс «Методы культуры клеток для биохимиков» (М., Мир, 1983). Статьи, включенные в настоящий сборник, дают представление об общем уровне исследований и о перспективах развития методов тканевых культур в современной биологии.

М. А. Панов

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние годы использование культур клеток животных из чисто экспериментальной процедуры превратилось в технологический компонент многих биологических исследований и производственных процессов. Возникли новые подходы, обеспечивающие расширение области применения и стандартизацию. Цель этой книги — сделать их достоянием ученых и технологов. К числу таких новых направлений следует отнести значительное расширение использования бессывороточных культур и получение препаративных культур животных клеток на промышленном и полупромышленном уровнях. В настоящее время не вызывает сомнений необходимость строгого описания, стандартизации и создания банков клеточных линий. Материалы этой книги помогут читателю создавать собственные банки клеточных линий, а также использовать центральные банки и коллекции клеток.

Аналитическое и препаративное фракционирование клеток рассмотрено в двух главах, посвященных проточной цитометрии и элютриационному центрифугированию. Методы анализа на клеточном и субклеточном уровнях приведены в главе, посвященной гибридизации *in situ*. В главе, посвященной органной культуре, подчеркнуто значение клеточных взаимодействий и сохранения гистологической структуры ткани и приведены стандартные методы ведения органной культуры. Наконец, в главе, посвященной определению жизнеспособности клеток и оценке цитотоксичности, рассматриваются проблемы токсикологии и скрининга противоопухолевых препаратов, а также стандартные методы оценки выживаемости клеток в культуре.

Р. Айэн Фрешни

СПИСОК АВТОРОВ

- D. Conkie.* Beatson Institute for Cancer Research, Wolfson Laboratory for Molecular Pathology, Glasgow, UK.
- E. Erba.* Istituto di Ricerche Farmacologiche «Mario Negri», Milano, Italy.
- R. I. Freshney.* Cancer Research Campaign, Department of Oncology, University of Glasgow, Glasgow, UK.
- B. Griffiths.* PHLS CAMR, Porton, Salisbury, Wiltshire, UK.
- R. J. Hay.* American Type Culture Collection, Rockville, USA.
- I. Lasnitzki.* Strangeways Laboratory, Cambridge, UK.
- H. R. Maurer.* Freie Universität Berlin, Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazie (WE1), Berlin, FRG.
- L. Morasca.* Istituto di Ricerche Farmacologiche «Mario Negri», Milano, Italy.
- A. P. Wilson.* Department of Reproductive Pathology, St Mary's Hospital, Manchester, UK.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АСР — активность, стимулирующая размножение
БВ — бидистиллированная вода
БСА — бычий сывороточный альбумин
ДМСО — диметилсульфоксид
ДЭАЭ — диэтиламиноэтил
ИД₅₀ — доза, ингибирующая на 50 %
ИД₉₀ — доза, ингибирующая на 90 %
ИНТХ — 2- (п-иодофенил) -3- (п-нитрофенил) -5-фенилтетразо-
лийхлорид
ИФР — инсулино-подобный фактор роста
ИЭФ — изоэлектрическая фокусировка
ИУДР — иод-урацилдезоксирибозид
ЛАЧ — лейкоцитарные антигены человека
ПГ — простагландин
СПЭ — скорость переноса электронов
ТХУ — трихлоруксусная кислота
ФИТЦ — флуоресцеин изотиоцианат
ФРН — фактор роста нервов
ФРСТ — фактор роста, синтезируемый тромбоцитами
ФРФ — фактор роста фибробластов
ФРЭ — фактор роста эпидермиса
ФСБ — фосфатно-солевой буфер
ФЭУ — фотоэлектронный умножитель
ХМ — хориоаллантоисная мембрана
ЦПЭ — цитопатогенный эффект
ЭДТА — этилендиаминтетраацетат
АТСС — американская коллекция типовых культур (Ameri-
can Type Culture Collection)
БУДР — 5-Бромурацилдезоксирибозид
DME — минимальная среда Игла в модификации Дюль-
бекко
IMDM — модифицированная Исковым среда Дюльбекко
MEM — минимальная среда Игла

ВВЕДЕНИЕ. ПРИНЦИПЫ СТЕРИЛЬНОЙ РАБОТЫ И ВЕДЕНИЕ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

Р. Фрешни

1. Введение

Культивирование клеток и тканей животных к настоящему времени получило широкое распространение в различных областях исследований, от клеточной и молекулярной биологии, до быстро прогрессирующих прикладных областей биотехнологии. Многие лаборатории располагают руководствами по культивированию клеток, и этот метод является существенной частью многих дипломных работ. Написано немало книг, знакомящих начинающего исследователя с основными принципами получения клеток, сохранения их стерильности и способности к размножению. Данное издание концентрирует внимание читателей на некоторых специальных аспектах, необходимых для более полного понимания проблемы и правильного использования техники культивирования.

В этой главе будут рассмотрены некоторые общие свойства культивируемых клеток, их биология, получение исходных популяций клеток и описание свойств этих популяций. Здесь же будут приведены основные определения и предположения.

2. Биология клеток в культуре

2.1. Происхождение и характеристика

Список типов клеток, которые в настоящее время можно культивировать, достаточно велик. Это элементы соединительной ткани (фибробласты), скелетные ткани (кость и хрящи), скелетные, сердечные и гладкие мышцы, эпителиальные ткани (печень, легкие, молочная железа, кожа, мочевого пузыря, почки), клетки нервной системы (глиальные клетки и нейроны, хотя последние лишены способности к пролиферации), эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз, клетки островков Лангерганса), меланоциты и много различных типов опухолевых клеток (подробнее см. [4]).

Использование маркёров, специфических для данного типа клеток (см. гл. 4), позволяет определять предков, от которых получены такие культуры, но далеко не во всех случаях уда-

ется установить положение клеток в их «родословной». Чтобы клетки пролиферировали, они должны происходить скорее от недифференцированных клеток-предшественников, чем от полностью дифференцированных клеток, у которых способность к пролиферации в норме утрачивается. Однако популяция не обязательно должна быть гомогенной и обладать фиксированным фенотипом. Некоторые культуры, например кератиноциты эпидермиса, содержат стволовые клетки, клетки-предшественники и кератинизированные чешуйчатые клетки. В такой культуре происходят постоянное обновление за счет стволовых клеток, пролиферация и созревание клеток-предшественников и терминальная необратимая дифференцировка, сопровождающаяся «сущиванием» чешуйчатых клеток в культуральную среду. Культуры других клеток, например фибробласты, представляют собой относительно однородную популяцию пролиферирующих клеток при низкой плотности монослоя ($\sim 10^4$ клеток/см²) и столь же однородную популяцию более дифференцированных, непролиферирующих клеток при высокой плотности монослоя (10^5 клеток/см²). Эта популяция фиброцит-подобных клеток при высокой плотности монослоя способна к возвращению в клеточный цикл в результате трипсинизации, снижающей плотность клеток в монослое, или соскоба части клеток, приводящего к появлению свободного «края» монослоя.

Дифференцировка и пролиферация клеток регулируются (во многих случаях реципрокно) не только плотностью монослоя [8], но и питательными факторами среды (сыворотка, ионы Ca^{2+}) [5], гормонами [6], взаимодействием с внеклеточным матриксом [7]. Важно, таким образом, не только установить родословную используемых клеток, но и охарактеризовать и стабилизировать стадию их дифференцировки, подбирая плотность клеток, а также питательные и гормональные факторы для получения однородной клеточной популяции.

Динамические свойства культивируемых клеток часто трудно контролировать, и некоторые клеточные взаимодействия, наблюдаемые *in vivo*, бывает трудно реконструировать *in vitro*. В связи с этим многие исследователи отказываются от идеи серийного размножения клеток *in vitro*, предпочитая использовать клеточные системы, сохраняющие структурную целостность исходной ткани. Такие системы, получившие название гистио-типических или органных культур, будут рассмотрены в гл. 7. Делались также попытки воссоздания тканеподобных структур *in vitro* путем агрегации различных типов клеток и их культивирования при высокой плотности в форме сфероидов [9], перфузируемой многослойной культуры на пластиковом или стеклянном субстрате [10], или культивирования на микроносителях (коллагеновые волокна [11] или синтетические микропористые фильтры [12]).

2.2. Дифференцировка

Ведение клеточных линий требует постоянного увеличения числа клеток. Поэтому неудивительно, что продолжавшийся много лет выбор условий культивирования был направлен на обеспечение максимальной скорости клеточной пролиферации. Эти условия, как правило, оказывались неблагоприятными для дифференцировки клеток, при которой их рост существенно ограничивается или полностью подавляется. К условиям, способствующим размножению, относятся низкая плотность клеток, низкая концентрация Ca^{2+} [13] (100—600 мкМ) и присутствие ростовых факторов, таких как фактор роста эпидермиса (ФРЭ), фактор роста фибробластов (ФРФ) и фактор роста, синтезируемый тромбоцитами (ФРСТ). Высокая плотность клеток (выше 10^5 клеток/см²), высокие концентрации Ca^{2+} (300—1500 мкМ) и присутствие индукторов дифференцировки (гормоны, например гидрокортизон [14], фактор созревания глии [15], фактор роста нервов [16], ретиноиды [17] и полярные растворители, такие как диметилсульфоксид [18]) способствуют прекращению клеточного деления и индуцируют дифференцировку клеток.

Роль сыворотки в дифференцировке до конца еще не выяснена, и действие ее зависит от типа клеток и состава используемой среды. Низкие концентрации сыворотки способствуют дифференцировке олигодендроцитов [19], но для дифференцировки бронхиального эпителия в ороговевающий используются высокие концентрации сыворотки [20]. В последнем случае активным началом оказываются молекулы сыворотки, близко родственные или идентичные фактору опухолевого роста β , выделяемому из тромбоцитов. Решению проблем, связанных с влиянием сыворотки на дифференцировку, несомненно будет способствовать использование химически определенных сред.

Большое значение, особенно для эпителия, имеет установление правильной полярности клеток и их формы. Во многих исследованиях было показано, что клетки, растущие на взвеси коллагенового геля, омываются питательной средой со всех сторон, и это позволяет устанавливать правильную полярность относительно базальной мембраны, а также поддерживать правильную форму клеток благодаря пластичности субстрата [21].

Итак, для размножения и дифференцировки клеток требуются различные условия культивирования. В ряде экспериментов требуется чередование фазы роста, результатом которой является наращивание клеточной массы, и фазы созревания, в которой клетки не растут, но в них экспрессируются те или иные признаки.

3. Выбор материала

Главным фактором при выборе ткани или линии клеток для дальнейшего исследования является природа процесса, который будет изучаться на этих клетках. Изучение таких общих клеточных процессов, как синтез ДНК, проницаемость мембран или определение цитотоксичности, может быть проведено на любых типах клеток. Исследование специализированных клеточных функций, таких как образование миотрубок, синтез антител или регуляция ферментов цикла мочевины, требует использования особых типов клеток, в которых происходит экспрессия этих функций.

3.1. Органная культура или культура клеток?

Исходно тканевыми культурами называли эксплантаты целых фрагментов тканей, полагая, что в этих фрагментах, по крайней мере частично, поддерживается гистологическая целостность. Теперь «культура ткани» превратилась в общее понятие, включающее в себя как органную культуру, в которой небольшие фрагменты ткани или целые эмбриональные органы эксплантируются с сохранением тканевой архитектуры, так и культуру клеток, когда ткани диспергируются механически, ферментативно или путем спонтанной миграции клеток из эксплантата, и клетки размножаются в виде суспензии или монослоя, прикрепившихся к субстрату клеток.

При выборе того или иного типа культуры следует принимать во внимание следующие соображения. Органная культура (см. гл. 7) сохраняет межклеточные взаимодействия, в течение долгого периода поддерживает гистологическую и биохимическую дифференцировку и после начальной травмы эксплантации и ряда центральных некрозов остается, как правило, в нерастущем равновесном состоянии в течение нескольких дней и даже недель. Эти культуры не способны к размножению, в эксперименте наблюдаются значительные разбросы в параллелях. Количественные исследования органных культур осложняются из-за небольших различий в геометрии и составе эксплантатов.

Культуры клеток, напротив, лишены, как правило, структурной организации, теряют характерную гистиотипическую архитектуру и связанные с ней биохимические признаки и обычно не достигают равновесного состояния при отсутствии специальных условий. Клетки в культурах размножаются, что обеспечивает получение большой массы клеток и их разделение на идентичные параллели. Культивируемые клетки могут быть охарактеризованы, и определенная клеточная популяция может быть сохранена путем замораживания. Клетки идентифицируют

по фенотипическим признакам, путем выращивания в селективной среде (см. гл. 2), физическим отбором (гл. 5 и 6), клонированием (см. гл. 4 и 8) или генотипически для получения относительно однородной линии клеток.

Свойства органных и клеточных культур представлены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Соответствующие преимущества клеточной и органной культуры

Органная культура	Культура клеток
Гистология Дифференцировка Гомотипическое и гетеротипическое клеточные взаимодействия Взаимодействие с мат-ринком	Размножение и получение биомассы Клонирование, селекция и очистка Выяснение свойств клеток и их сохранение Получение параллелей и количественные оценки

3.2. Источник ткани

3.2.1. Ткань эмбриона или взрослого животного

Как правило, культуры, полученные из эмбриональных тканей, характеризуются лучшей выживаемостью и более активным ростом по сравнению с культурами из соответствующих взрослых тканей. Это отражает, по-видимому, более низкий уровень специализации и наличие реплицирующихся клеток-предшественников или стволовых клеток в эмбрионах. Взрослые ткани обладают, как правило, пониженным пролиферативным пулом и более высоким содержанием неделящихся специализированных клеток, ассоциированных зачастую с более структурированным и слабо дезагрегирующим внеклеточным матриксом. Получение первичных культур клеток взрослых тканей и их размножение являются более сложной задачей, и продолжительность жизни таких культур, как правило, невелика.

Эмбриональные ткани обладают многими практическими преимуществами, но мы всегда должны помнить, что в ряде случаев эти клетки отличаются от взрослых клеток, и мы не можем быть уверены, что они созреют до соответствующего взрослого типа, если это не будет подтверждено результатами анализа соответствующих свойств.

В качестве примеров широко используемых линий эмбриональных клеток можно привести различные линии 3Т3 (мышечные)

ные эмбриональные фибробласты), линию MRC-5 и другие линии эмбриональных легочных фибробластов человека. Клетки мезодермального происхождения (фибробласты, эндотелий, миоциты) легче культивировать, чем эпителиальные клетки, нейроны и клетки эндокринных тканей. Этот вывод, однако, в значительной степени основан на преимущественном использовании фибробластов, а также на том, что для изучения ответов на митогенные факторы сыворотки использовали мезодермальные клетки. В настоящее время предложено большое количество новых селективных сред для эпителиальных и других типов клеток (см. гл. 2), и благодаря использованию этих культур удалось показать, что сыворотка может подавлять рост культуры и способствовать дифференцировке клеток.

3.2.2. Нормальная ткань или опухолевая?

Нормальные ткани, как правило, дают начало культурам с ограниченным временем жизни, тогда как культуры клеток, полученных из опухолей, способны пролиферировать неограниченно долгое время (см. ниже). Известно, однако, несколько линий неограниченно пролиферирующих клеток (клетки почки собаки MDCK, фибробласты 3T3), которые не прививаются при введении животным, то есть не являются опухолеродными.

Нормальные клетки растут обычно как недифференцированные стволовые клетки или клетки-предшественники, и наступление дифференцировки в такой культуре сопровождается часто полным прекращением пролиферации клеток. Некоторые нормальные клетки, например фиброциты и клетки эндотелия, способны дифференцироваться, затем дедифференцироваться, возобновлять пролиферацию и вновь дифференцироваться. Другие — например ороговевающий эпителий и многие кроветворные клетки — после инициации дифференцировки неспособны к возобновлению пролиферации.

В культурах клеток, полученных из опухолей, возможна, по крайней мере частичная, дифференцировка при сохранении способности к пролиферации. Во многих исследованиях используется такая способность опухолевых клеток. Для изучения дифференцировки вполне пригодны клетки мышиной меланомы B16, крысиные гепатомы с минимальными отклонениями [22], клетки нейробластом человека и грызунов [23]. При этом всегда остаются сомнения, можно ли применять полученные результаты к процессам нормальной дифференцировки.

Опухолевые ткани часто могут пассироваться на сингенных хозяевах, и это обеспечивает дешевый и простой способ получения большого количества клеток, хотя полученные популяции

могут быть недостаточно гомогенны. При отсутствии природных хозяев опухоли можно пассировать на бестимусных мышах. Этот метод несколько сложнее, но обладает теми же преимуществами.

Многие другие различия между нормальными и злокачественными клетками аналогичны различиям между ограниченными и постоянными линиями клеток (см. ниже), есть данные о важности приобретения «бессмертия» в неопластической трансформации клеток [24].

3.3. Субкультивирование

Свежевыделенные культуры носят название первичных культур до начала пассирования или субкультивирования. Клетки первичной культуры обычно гетерогенны и характеризуются малым пролиферативным пулом, но в них наиболее полно представлены типы клеток той ткани, откуда они были получены, а также четко обнаруживается экспрессия ряда свойств, присущих данной ткани. Субкультивирование обеспечивает возможность продления существования культуры (в результате субкультивирования получают линии клеток), возможность клонирования (см. гл. 4 и 8), исследования и сохранения клеток (гл. 4), а также получения более однородных популяций. При этом во многих случаях субкультивирование приводит к потере специализированных клеток и дифференцировочных признаков, если не принимаются меры для отбора специализированных линий, и сохранения или реиндукции дифференцировочных свойств (см. ниже).

Главным преимуществом получения клеточных линий из первичных культур является наработка большого количества стабильного материала, пригодного для продолжительного использования.

3.3.1. Ограниченные или постоянные клеточные линии!

После нескольких пассажей линия клеток либо гибнет (ограниченная линия клеток), либо «трансформируется» и становится постоянной клеточной линией. Не всегда ясно, возникают стволовые клетки постоянной культуры в ходе пассирования, или они предсуществуют в замаскированной форме в популяции клеток ограниченной линии. Различия в свойствах этих клеток и большой период времени, предшествующий их появлению (иногда несколько месяцев), позволяют предположить мутационную природу их появления (хромосомные перестройки, транслокации, частичное или полное неспаривание или точечные мутации). Нельзя исключить и возможность предсуществования «бессмертных» клеток, особенно в культурах, полученных из опухолей.

Появление постоянной линии клеток констатируется по морфологическим изменениям (уменьшение размера клеток, снижение их адгезивности, округление и увеличение ядерно/цитоплазматического отношения), по увеличению скорости роста (время удвоения клеток в культуре снижается с 36—48 до 12—36 ч), по снижению зависимости от сыворотки, по увеличению эффективности клонирования, по снижению зависимости от субстрата (способность пролиферировать в суспензии вырастет так же, как и формирование клонов в агаре), по увеличению гетеропloidности (хромосомные различия между клетками) и анеупloidности (отличие от донорского эупloidного кариотипа) и по увеличению опухолеродности. Черты сходства между спонтанной трансформацией *in vitro* и злокачественной трансформацией очевидны, но тем не менее нельзя считать эти два процесса идентичными. Нормальные клетки могут трансформироваться в постоянную линию, не становясь при этом злокачественными; из злокачественных опухолей можно получить культуры, которые трансформируются и приобретают указанные выше признаки и при этом становятся более, а иногда менее опухолеродными.

К преимуществам постоянных линий клеток относятся их более высокая скорость роста, возможность достижения более высокой плотности, а следовательно, и большего выхода биомассы, их меньшая зависимость от сыворотки и возможность поддержания в более простых средах, а также их способность к росту в суспензии. К недостаткам этих линий относятся повышенная хромосомная нестабильность, отклонение от фенотипа донора и утрата специфических тканевых маркеров.

3.3.2. Размножение в суспензии

Клетки большинства культур, включая первичные, размножаются в форме монослоя, прикрепившись к стеклу или пластиковому субстрату. Некоторые культуры, главным образом трансформированные клетки, кроветворные клетки и асцитные опухоли, могут размножаться в суспензии. Этим обеспечивается простота размножения (субкультивирование требует только разведения без трипсинизации), отсутствие необходимости увеличения площади поверхности роста наряду с возрастанием объема, простота сбора клеток и возможности получения в случае необходимости «равновесной» культуры (см. гл. 3).

3.4. Выбор среды

Выбор среды, к сожалению, часто происходит чисто эмпирически и диктуется, в частности, тем, какую среду использовали в вашей лаборатории для работы с другими клетками или ка-

кую среду использовали ранее другие исследователи для работы с клетками, аналогичными вашим. Это не столь важно для постоянных линий клеток, но при работе со специализированными клетками, с первичными культурами, при выращивании клеток в отсутствие сыворотки выбор среды может иметь принципиальное значение. Более подробно эта проблема будет рассмотрена в гл. 2.

Использование более сложных сред в отсутствие сыворотки обеспечивает два преимущества: такие среды могут быть селективными для определенного типа клеток, а отсутствие сыворотки облегчает выделение из среды требуемых продуктов клеточного метаболизма.

Тем не менее культивирование в присутствии сыворотки проще и, как ни странно, часто оказывается не более дорогим, хотя, конечно, менее контролируемо. Две главные причины все еще ограничивают применение бессывороточных сред: а) очень медленно растет выпуск коммерческих ингредиентов таких сред (не многие исследователи способны изготавливать среды собственными силами) и б) потребности в бессывороточной среде в большей степени зависят от типа используемых клеток. Сыворотка нивелирует многие недостатки среды, которые могут проявляться в ее отсутствие. Проблема может стать особенно острой при культивировании опухолевых клеток; клеточные линии, происходящие из разных опухолей, могут требовать модификации культуральной среды.

В конце концов выбор среды все еще остается эмпирическим. Просмотрите литературу и выясните, какая среда использовалась ранее. Если использовалось несколько различных сред (как это чаще всего и бывает), проверьте все эти среды, а также некоторые другие по вашему выбору. Оцените рост культуры (время генерации и плотность насыщения) (см. ниже), эффективность клонирования (гл. 8), экспрессию специфических свойств (дифференцировка, размножение вируса, выход клеточного продукта и т. д.). Выбор среды может оказаться неодинаковым по этим параметрам: так, например, дифференцировка легочного эпителия лучше проходит в присутствии сыворотки, а размножение этих клеток — в отсутствие сыворотки. Если возможно, используйте в своей работе одну или несколько бессывороточных сред с добавлением в случае необходимости факторов роста, гормонов и микроэлементов (см. гл. 2).

Остановившись на каком-то одном типе среды, старайтесь как можно дольше его не менять. Аналогично при использовании сыворотки постарайтесь обеспечить себя сывороткой одной партии на 0,5—1 год работы, прежде чем заменить ее на предвительно опробованную сыворотку другой партии.

3.5. Газовая фаза

Состав газовой фазы определяется тремя факторами: а) типом среды, б) использованием открытых (чашки Петри, многоруночные чашки) или закупоренных (флаконы, бутылки) культуральных сосудов и в) требуемой буферной емкостью. Некоторые параметры культивирования могут варьировать, но должны соблюдаться одно главное правило и три основных условия. Правило заключается в том, что концентрация бикарбоната и парциальное давление CO_2 должны находиться в равновесии. Три основных условия можно суммировать следующим образом:

	HCO_3	Газовая фаза	НЕРЕС
1. Низкая буферная емкость, герметично закрытые флаконы	4 mM	Воздух	—
2. Умеренная буферная емкость, открытые или герметично закрытые флаконы	23 mM	5% CO_2	—
3. Высокая буферная емкость, открытые или герметично закрытые флаконы	8 mM	2% CO_2	20 mM

Следует помнить, что отношение CO_2/HCO_3 существенно для большинства клеток, так что ни флаконы, ни чашки не могут быть использованы без наличия CO_2 в атмосфере.

Доведите pH среды до 7,1—7,2 при комнатной температуре и проинкубируйте в ней клетки в неглубокой чашке в течение 30 мин при нужном парциальном давлении CO_2 . Убедитесь, что pH среды стабилизировался при значении 7,4. В случае необходимости подведите pH с помощью стерильных 1 N HCl или 1 N NaOH.

Парциальное давление кислорода обычно поддерживается на атмосферном уровне. Известны, однако, исключения: повышение концентрации O_2 в газовой фазе органических культур (см. гл. 7) и снижение концентрации при клонировании меланомы (см. гл. 8).

3.6. Субстрат

Природа субстрата определяется главным образом типом используемых клеток и характером проводимых исследований. Почти повсеместное распространение получил в настоящее время полистирол, обработанный таким образом, чтобы увеличить смачиваемость и придать поверхности отрицательный заряд. В особых случаях (культуры нейронов, мышечных клеток и некоторые культуры эпителиальных клеток) пластиковая поверхность покрывается желатином, коллагеном или полилизин-

ном для придания ей положительного заряда. Может быть использована и стеклянная посуда, но она должна быть тщательно вымыта с применением нетоксичных детергентов (см. ниже).

Культуральные сосуды варьируют по размеру от многолуночных пластинок Тerasки (площадь поверхности $\sim 1 \text{ мм}^2$, объем среды 5—10 мкл) и микротитровальных пластинок ($\sim 30 \text{ мм}^3/100\text{—}200$ мкл) до набора чашек и флаконов с площадью поверхности до 180 см^2 и вращающихся бутылей и мультиповерхностных пропагаторов для крупных культур (см. гл. 3). Определяющими факторами при выборе культуральной посуды являются требуемое количество клеток (максимальная плотность большинства трансформированных культур $5 \cdot 10^4\text{—}10^5$ клеток/ см^2), требуемое количество параллелей (96 для микротитровальной пластинки) и порядок отбора образцов. 24-луночные чашки достаточно хороши для большого количества параллелей при одновременном отборе образцов, но когда отбор образцов производится в разное время, предпочтительнее использовать индивидуальные флаконы или бутылки. Чашки Петри дешевле флаконов и достаточно удобны для последующих обработок клеток, например при окрашивании или экстракции. Флаконы могут быть герметично закрыты; при этом не требуется инкубатора с продувкой CO_2 ; кроме того, при использовании флаконов снижается опасность заражения культур.

В случае суспензионных культур главным определяющим фактором является объем сосуда. При увеличении объема могут создаваться проблемы в перемешивании и аэрации культур (см. гл. 3).

4. Подготовка

4.1. Субстрат

Во многих лабораториях в настоящее время для культур тканей используется пластмассовая посуда одноразового применения. Эти сосуды оптически прозрачны и подготовлены для использования в культивировании тканей путем модификации пластика, увеличивающей его смачиваемость и облегчающей прикрепление клеток. Некоторые культуральные сосуды выпускаются в стерилизованном виде. В целом пластмассовую посуду удобно применять и в процессе наращивания клеток, и для решения экспериментальных задач. В то же время одноразовая культуральная посуда является дорогой.

4.1.1. Мытье стеклянной культуральной посуды

Для пассирования постоянных и многих ограниченных линий клеток вполне подходит стеклянная культуральная посуда при условии, что вы обладаете отделением для мытья посуды

и возможностью контроля качества чистой посуды. Следует использовать нетоксичные детергенты. Посуда должна выдерживаться в растворе детергента предпочтительно в течение ночи и после этого тщательно промываться проточной и затем деионизованной или дистиллированной водой. Важно, чтобы вся стеклянная посуда, указанная в последующих главах, соответствовала или превосходила указанную спецификацию.

4.1.2. Стерилизация стеклянной посуды

Пластиковая посуда поступает в стерильном виде, а стеклянная культуральная посуда перед употреблением должна быть простерилизована. Все прописи, приведенные в последующих главах, предусматривают использование стерильной стеклянной посуды. Во многих лабораториях проводится массовая стерилизация всей посуды независимо от ее непосредственного использования для культивирования. Это исключает возможность ошибки в выборе посуды из стерильных и нестерильных источников.

Стерилизацию лучше всего проводить в сухожаровом стерилизаторе (160°C в течение 1 ч), помещая посуду в контейнеры или заворачивая в фольгу. Завинчивающиеся крышки сосудов автоклавируются отдельно.

Качество посуды, процесс ее мытья и выбор детергента следует периодически проверять. Для этого лучше всего промыть посуду обычным образом, оценить чистоту на глаз, высушить, простерилизовать и использовать для клонирования клеток в монослое (гл. 4 и 8) предпочтительно при низкой концентрации сыворотки (2—5%) или в ее отсутствие (см. гл. 2).

4.2. Среда

Большинство обычно используемых сред поставляется производственными предприятиями, но среды специального состава (см. гл. 4) или добавки к ним приходится готовить и стерилизовать самостоятельно. Как правило, стабильные растворы (вода, солевые растворы и такие добавки к средам, как триптоза и пептон) стерилизуются автоклавированием (121°C при 1 атм избыточного давления). Нестабильные растворы (полная среда, трипсин, сыворотка) стерилизуются фильтрованием через мембраны с диаметром пор 0,2 мкм (фирмы Millipore, Sartorius, Gelman, Pall).

При использовании автоматизированных автоклавов нужно следить, чтобы продолжительность цикла определялась температурой загруженного материала, а не величиной давления или температурой камеры или теплоносителя, которые увеличивают

ся с большей скоростью, чем температура автоклавируемого материала.

Проверка стерильности (см. гл. 4) должна проводиться для каждого фильтрованного образца.

4.3. Клетки

4.3.1. Первичная культура

Первичной называется культура, полученная из ткани и выращиваемая *in vitro* до начала субкультивирования, то есть до первого пересева. Первичная культура лишена многих клеток, присутствующих в исходной ткани, поскольку не все клетки способны прикрепиться к субстрату и выжить в условиях *in vitro*. Далее, при пролиферации культивируемых клеток происходит относительное обеднение культуры неделящимися или медленно делящимися клетками. Поэтому на этой стадии может оказаться необходимым проведение отбора специфических типов клеток путем клонирования, селективного культивирования (гл. 2) или физического разделения клеток (гл. 5 и 6).

На первом этапе получения первичной культуры происходит стерильное удаление фрагмента ткани животного и его механическая или ферментативная дезагрегация. Ткань может быть просто измельчена до кусочков объемом около 1 мм³, которые прикрепляются к поверхности чашки благодаря собственной адгезивности, или наличию насечек на чашке или с помощью сгустка плазмы [1]. В этих случаях будет происходить рост клеток из фрагментов и клетки, мигрирующие из эксплантатов, могут использоваться для пассирования. Фрагменты ткани (эксплантаты) могут переноситься на новые чашки; мигрирующие клетки могут удаляться трипсинизацией, а остающийся эксплантат будет образовывать новые выросты. Трипсинизированные клетки пересеваются в новые сосуды и становятся вторичной культурой. По формальным признакам такая культура носит название линии клеток.

Первичные культуры могут быть также получены путем дезагрегации тканей ферментами, например трипсином (0,25%-ный неочищенный или 0,01—0,05%-ный очищенный) или коллагеназой (200—2000 ед./мл, неочищенная). Клетки образующейся при этом суспензии оседают, прикрепляются и расплываются на поверхности стекла или пластика [1]. Такой способ получения культуры обеспечивает более высокий выход клеток, хотя он кажется более селективным, поскольку только определенные клетки переживают диссоциацию. На практике успешное получение первичных культур из многих тканей, особенно из эпителия, связано с использованием коллагеназы; при этом размер эксплантата снижается до небольшого класте-

ра клеток, который затем прикрепляется к субстрату и разрастается [25].

Более подробно о методах получения первичных культур см. [1].

4.3.2. Субкультивирование

Монослойная культура может быть перенесена во второй культуральный сосуд после диссоциации клеток монослоя трипсином и разведения. В случае субкультивирования суспензионных культур достаточно только разведения. Диссоциация клеток монослойной культуры достигается лучше всего промыванием монослоя фосфатным солевым буфером (ФСБ) или ФСБ с 1мМ этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) и последующей инкубацией с холодным раствором трипсина (0,25%-ный неочищенный или 0,01—0,05%-ный очищенный) в течение 30 с. После этого трипсин удаляется, клетки инкубируют дополнительно в течение 15 мин. Затем клетки суспендируют в среде, определяют их количество и засевают на новые флаконы.

4.3.3. Кривая роста

После посева клеток во флакон они входят в лаг-период продолжительностью 2—24 ч, сменяющийся периодом экспоненциального роста (логарифмическая фаза). В конце этого периода клетки достигают плотного монослоя и входят в период медленного роста или покоя (фаза плато) (см. рис. 1.1). Эти фазы характерны для всех клеточных линий и позволяют получить воспроизводимые характеристики клеточных линий: продолжительность лаг-периода, время удвоения популяции в середине логарифмической фазы и насыщающую плотность клеток в монослое на фазе плато. Воспроизводимость этих характеристик возможна только при постоянстве условий культивирования.

Определение параметров ростового цикла весьма существенно для пассирования культуры и для проведения экспериментов на культурах. Поведение клеток и их биохимические свойства заметно различаются на разных фазах роста культуры, так что важно контролировать стадию ростового цикла, на которой в культуру добавляются различные препараты или реагенты или производится сбор клеток для пересева. Форма кривой роста позволяет также получить информацию о репродуктивном потенциале культуры (рис. 1.1). Не вызывает сомнения, что клональный анализ довольно прост и приводит к получению более однозначных и правильных выводов.

Проблемы роста и жизнеспособности клеток более подробно рассмотрены в гл. 8.

4.3.4. Замена среды

Некоторые быстроделющиеся культуры, например постоянные линии клеток, таких как HeLa, требуют смены среды после 3—4 сут культивирования. На необходимость смены среды обычно указывает значение рН ниже 7,0.



Рис. 1.1. Гипотетические кривые роста для начальной концентрации клеток 10⁴ клеток/мл. Из графика следует необходимость анализа всей кривой, а не подсчета клеток в одной временной точке.

4.3.5. Заражение культуры клеток

Опасность микробного заражения культур в значительной мере снижена благодаря использованию антибиотиков и ламинарных боксов. Однако следует по мере возможности избегать культивирования клеток с антибиотиками, поскольку проблема хронического латентного заражения все еще остается острой.

Следует как можно чаще производить визуальную оценку микробного заражения культуры по быстрому изменению рН. Как правило, заражение сопровождается снижением рН, хотя некоторые грибы могут индуцировать увеличение рН. Заражение может также приводить к помутнению среды, появлению межклеточного гранулярного материала при микроскопическом обследовании и к появлению взвешенного в среде неидентифицированного материала. Во всех этих случаях культуральные

сосуды изолируются без открывания пробок и автоклавируются.

В сомнительных случаях образцы культуры следует исследовать в фазово-контрастном микроскопе, путем окраски по Граму и с помощью стандартных микробиологических методов (см. гл. 4).

Микоплазма. Источником заражения микоплазмой при культивировании клеток могут быть культуральная среда, сыворотка, трипсин или сам исследователь. Заражение не выявляется невооруженным глазом, и, поскольку оно не приводит к изменению роста культуры, заражение микоплазмой часто остается незамеченным. Следует регулярно (один раз каждые 1—3 мес) проверять культуры на наличие в них микоплазмы, поскольку такое заражение существенно изменяет биохимию клеток, их антигенные свойства и параметры роста культуры. Предложено несколько методов выявления микоплазмы, но наибольшее распространение получил метод флуоресцентного окрашивания ДНК по методу Чена (см. гл. 4).

4.3.6. Заражение культуры другими клетками

Эта проблема будет подробно рассмотрена в гл. 4. Ее важность недооценивается, однако последствия ее проявляются очень часто. Чтобы избежать перекрестного загрязнения культур, не следует использовать одни и те же бутылки со средой и реагентами при работе с различными линиями клеток. Кроме того, пипетки, имевшие контакт с флаконами и бутылками с клетками, не следует повторно использовать для отбора среды из соответствующих емкостей.

Литература

1. *Freshney R. I.* (1983). *Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique*, Alan Liss Inc., New York.
2. *Paul J.* (1975). *Cell and Tissue Culture*, Vth edition, Livingstone, Edinburgh.
3. *Adams R. L. P.* (1980). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology — Cell Culture for Biochemists* Work T. S., Burdon R. H. (eds.), Elsevier, Amsterdam.
4. *Harris C. C., Trump B. F., Stoner G. D.* (1980). *Normal Human Tissue and Cell Culture, Methods in Cell Biology*, Vol. 21, Academic Press, New York.
5. *Wakelam M. J. O.* (1985). *Biochem. J.*, 228, 1.
6. *Cunha G. R., Chung L. W. K.* (1981). *J. Steroid Biochem.*, 14, 1317.
7. *Kemp R. B., Hinchliffe J. R.* (1984). *Matrices and Cell Differentiation, Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 15, Alan Liss, Inc, New York.
8. *Frame M. C., Freshney R. I., Vaughan P. F. T., Graham D. I., Shaw R.* (1984). *Br. J. Cancer*, 49, 269.
9. *Freyer J. P., Sutherland R. M.* (1980). *Cancer Res.*, 40, 3956.
10. *Kruse P. F. Jr., Miedema E.* (1965). *J. Cell. Biol.*, 27, 273.
11. *Michalopoulos G., Pitot H. C.* (1975). *Fed. Proc.*, 34, 826.
12. *Chambard M., Verrier B., Gabrion J., Mauchamp J.* (1983). *J. Cell. Biol.*, 96, 1172.

13. Peehl D. M., Ham R. G. (1980). *In Vitro*, **16**, 526.
14. Piddington R., Moscona A. A. (1967). *Biochim. Biophys. Acta*, **141**, 429.
15. Kato T., Fukui Y., Turriji D. E., Nakagawa S., Lim R., Arnason B. G. W., Tanaka R. (1981). *Brain Res.*, **212**, 393.
16. Levi-Montalcini R. (1964). *Science*, **143**, 105.
17. Sporn M. B., Roberts A. B. (1983). *Cancer Res.*, **43**, 3034.
18. Friend C., Scher W., Holland J. G., Sato T. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 378.
19. Raff M. C., Miller R. H., Noble M. (1983). *Nature*, **303**, 390.
20. Lechner J. F., McClendon I. A., Lavesk M. A., Shamsuddin A. M., Harris C. C. (1983). *Cancer Res.*, **43**, 5915.
21. Sattler C. A., Michalopoulos G., Sattler G. L., Pitot H. C. (1978). *Cancer Res.*, **38**, 1539.
22. Pitot H., Peraino C., Morse P., Potter V. R. (1964). *Natl. Cancer Inst. Monographs*, **13**, 229.
23. Littauer U. Z., Giovanni M. Y., Glick M. C. (1979). *Biochem. Res. Commun.*, **88**, 933.
24. Land H., Parada L. F., Weinberg R. A. (1983). *Nature*, **304**, 596.
25. Freshney R. I. (1972). *Lancet*, **II**, 488.
26. Ham R. G., McKeehan W. L. (1978). *In Vitro*, **14**, 11.

РАЗРАБОТКА ХИМИЧЕСКИ-ОПРЕДЕЛЕННЫХ БЕССЫВОРОТОЧНЫХ СРЕД ДЛЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Г. Маурер

1. Введение

После извлечения клеток из ткани или организма и помещения их в культуру культуральная среда должна обеспечивать все внешние условия, которые клетки имели *in vivo*. Только в этом случае возможны выживание клеток, их пролиферация и дифференцировка. Внеклеточная среда должна обладать всем необходимым для выживания и роста, то есть обеспечивать клетки питательными и гормональными факторами, а также факторами стромы. Среди биологических сред, оказавшихся пригодными для культивирования клеток вне организма, наибольшее распространение получила сыворотка. И хотя уже частично выяснены потребности клеток, для удовлетворения которых составляют сложные химически определенные среды, добавление 5—20% сыворотки было и, как правило, все еще остается необходимым для поддержания оптимального роста клеток. Часто по различным причинам бывает необходимо избавиться от неидентифицированных компонентов сыворотки, то есть получить химически вполне определенную среду. Различные подходы к созданию таких сред и возникающие при этом проблемы уже нашли отражение в научной литературе [1—9].

2. Роль сыворотки при культивировании клеток

2.1. Роль компонентов сыворотки

Сыворотка представляет собой чрезвычайно сложную смесь множества мелких и крупных молекул, способных как вызывать, так и тормозить рост клеток. Некоторые компоненты сыворотки, способные поддерживать выживание и рост многих клеток млекопитающих в культуре, перечислены в табл. 2.1.

К главным функциям сыворотки относятся:

- I. обеспечение гормональными факторами, стимулирующими рост клеток и их функции;
- II. обеспечение факторами прикрепления и распластывания клеток (создание биоматрикса);
- III. обеспечение транспортными белками, переносящими гормоны, минеральные вещества, липиды и т. д.

**Таблица 2.1. Главные компоненты сыворотки,
необходимые для выживания и роста клеток**

Компонент	Основные функции
<i>Белки</i>	
Альбумин	Переносит липиды, гормоны, минеральные вещества. Обеспечивает осмотическое давление, буферную емкость
Фибронектин	Вызывает прикрепление клеток к субстрату
α_2 -Макроглобулин	Подавляет активность трипсина
Фетuin	Облегчает прикрепление клеток
Трансферрин	Связывает Fe^{2+}
<i>Полипептиды и факторы роста</i>	
Инсулин-подобные факторы роста I и II (ИФР)	Митогены
Инсулин	Повышает накопление глюкозы и аминокислот клетками
Соматомедины А и С	Митогены
Активность, стимулирующая размножение (АСР)	Митоген
Фактор роста, синтезируемый тромбоцитами (ФРСТ)	Митоген для фибробластов, гладкомышечных клеток и др.
Фактор роста эпидермиса (ФРЭ)	Митоген
Фактор роста фибробластов (ФРФ)	Митоген
Фактор роста эндотелия	Митоген
Фактор роста из глаза	Митоген
<i>Пептиды</i>	
Глутатион	Окислительно-восстановительные реакции
<i>Другие гормоны</i>	
Кортизол (гидрокортизон)	Вызывает прикрепление клеток, индуцирует клеточную дифференцировку
Эстрогены, андрогены	Митогены
Гормоны щитовидной железы (тироксин, трийодтиронин)	Дыхание, энергетический метаболизм. Вызывают рост и дифференцировку различных клеток
<i>Липиды</i>	
Линолевая кислота	Биосинтез мембран
Простагландины	Биосинтез мембран
Холестерин	
<i>Метаболиты</i>	
Аминокислоты	Пролиферация клеток
α -Кето-кислоты (пируват)	
Полиамины	
<i>Минеральные вещества</i>	
Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , SeO_3^{2+} , Co^{2+} , VO_3^- , $Mo_7O_{24}^{6-}$	Различные функции, в том числе активация ферментов

2.1.1. Факторы роста

Большинство ростовых факторов присутствуют в сыворотке в концентрации нескольких нанограммов на миллилитр и ниже. Некоторые из этих факторов специфичны для клеток на определенной стадии дифференцировки, как, например, гематопоэтический фактор роста (колониестимулирующий фактор). Некоторые факторы действуют синергически, а действие ряда факторов не ограничено каким-либо одним типом клеток. Так, ФРЭ способствует пролиферации фибробластов, эпидермальных клеток и клеток глии. Один и тот же тип клеток может быть стимулирован различными ростовыми факторами. Так, фибробласты размножаются в ответ на ФРФ, ФРЭ, ФРСТ и соматомедины. К настоящему времени физиологическая роль всех этих многочисленных факторов не выяснена. Более подробно ознакомиться с ростовыми факторами можно, обратившись к работе [10].

2.1.2. Гормоны

Среди гормонов наиболее важным для обеспечения роста почти всех типов клеток в культуре оказывается инсулин. Этот гормон обычно добавляют в культуру в относительно высокой концентрации, так как он быстро распадается, а также инактивируется цистеином. Глюкокортикоиды (гидрокортизон, дексаметазон) могут стимулировать или подавлять рост клеток в культуре в зависимости от типа клеток и их плотности. Глюкокортикоиды влияют на пролиферацию клеток, изменяя их чувствительность к факторам роста. Некоторые линии клеток нуждаются в других стероидных гормонах (эстрадиол, тестостерон, прогестерон; см. табл. 2.2). Гормоны щитовидной железы (главным образом трийодтиронин) оказываются активными в поддержании роста некоторых клеточных линий (см. табл. 2.2; в таблице приведены ссылки на работы, в которых была показана активность этих и некоторых других факторов в поддержании роста клеток в культуре).

2.1.3. Факторы прикрепления и распластывания

Одной из главных функций сыворотки является обеспечение клеток факторами прикрепления и распластывания, незаменимыми компонентами внеклеточного матрикса.

Многие клетки млекопитающих, прежде чем начать пролиферацию и образовать клеточный монослой, должны прикрепиться к субстрату и распластаться на нем. Роль факторов (в частности, коллагена и фибронектина), требующихся для прикрепления и распластывания клеток, будет рассмотрена ниже (см. разд. 3.2.3).

Таблица 2.2. Бессывороточные среды и среды с низким содержанием белков в удобной для компьютерной обработки экспоненциальной форме:

Тип клеток	Первый автор	Основная среда	Инсулин, мкг/мл	Трансферрин, мкг/мл	Селениг, Е-9	ФРЭ, нг/мл	ФРФ, нг/мл	Гидрокортизон, Е-6	Дексаметазон, Е-6
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Нетрансформированные диплондные клетки

1. Фибробласты человека	Nam [8]	MCDB110	0,95			30			1,4
2. Фибробласты кур	Nam [8]	MCDB202	20			20			—
3. Фибробласты овец	Nam [8]	MCDB202	10			—			1,0
4. Диплондные фибробласты человека (MRC-5)	Clark [20]	DME/199 (1:1)	1	25	(15)	10			50 нг/мл
5. Фибробласты легких человека (WIT-38)	McKeehan [21]	MCDB104	5	5		100			55 нг/мл
6. Кератиноциты человека	Nam [8]	MCDB104	5			5		1,4	
7. Бронхоэпителиальные клетки человека	Nam [8]	MCDB152	5	10		5		0,5	
8. Клетки эпителия молочной железы человека	Nam [8]	MCDB170	5	5		25		1,4	
9. Хондроциты кролика	Jennings [22]	MCDB104	1				100		

для различных типов клеток млекопитающих. Концентрации приведены: выражение 1,0 E-6 обозначает $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M} = 1 \text{ мкМ}$.

Т ₃ , E-9	Прогестерон, E-9	Путресцин, E-4	Фибринский, мкг/мл	БСА, мг/мл	Этаноламин	Фосфотанол-амин	Дополнительные компоненты
11	12	13	14	15	16	17	18

							ПГ E ₁ 2,5 E-8 и ПГF ₂₂ 2,0 E-6; дигтиотреитол 6,5 E-6; глутатион 6,5 E-7; фосфоенолпируват 1,0 E-5; липосомы В (10 мкл/мл), лецитин бобов сои (6 нг/мл), холестерин (3 мкг/мл), сфингомиелин (1 мкг/мл), витамин Е (0,06 мкг/мл), витамин Е-ацетат (0,2 мкг/мл)
							Липосомы В (10 мкл/мл) (см. выше)
							Липосомы В (30 мкл/мл) (см. выше)
		1	2	2			Фетунн (1 мг/мл), молибдат 5,0 E-10, НЕРЕС 1,0 E-2
			5				ФРСТ 1 мкг/мл
					1,0E-4	1,0E-4	
					5,0E-7	5,0E-7	
					1,0E-4	1,0E-4	ПГЕ ₁ 2,5 E-8, про-лактин (5 мкг/мл)
							Липосомы В (5 мкг/мл) (см. № 1)

Тип клеток	Первый автор	Основная среда	Инсулин, мкг/мл	Трансферрин, мкг/мл	Селенит, Е-9	ФРЭ, нг/мл	ФРФ, нг/мл	Гидрокортизон, Е-6	Дексаметазон, Е-6
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10. Хондроциты суставов кролика	Adolphe [23]	F12	5	5		4 нг/мл	100		20 нг/мл
11. Клетки предстательной железы человека	Chaproniere-Rickenburg [24]	RPMI1640	12	1		10			0,01
12. Линия клеток тестикулярного эпителия мыши (ТМ4)	Bottenstein [3]	DME/F12 (1 : 1)	5	5		3			
13. Нейроны	Bunge [25]	DME/F12 (1 : 1)	5	100	30				10 ед/мл
14. Астроциты мыши	Fisher [26]	DME—Эрл	10	100	30	10 нМ			
15. Клетки мозга эмбриона крысы	Honegger [27]	DME	5	1					0,02
16. Клетки гипофиза крысы	Lang [28]	DME/F12 (1 : 1)	5	5	50	40	10		
17. Клетки гипоталамуса крысы	Lang [28]	DME/F12 (1 : 1)	5	100	30			8 нг/мл	
18. Клетки гранулозы крысы	Orly [29]	DME/F12 (1 : 1)	2	5				40 нг/мл	

Т ₃ , Е-9	Прогестерон, Е-9	Путресцин, Е-4	Фибронектин, мкг/мл	БСА, мг/мл	Этаноламин	Фосфотанол- амин	Дополнительные ком- поненты
11	12	13	14	15	16	17	18
			2	1			Соматотропин быка (10 мкг/мл), тром- бин (1 мкг/мл), АСР 0,05 мкг ZnCl ₂ 1,0 Е-8
		20	100				Фолликулостимули- рующий гормон (0,5 мкг/мл), сома- томедин С (1 нг/мл), соматотропин овцы (6,5 мкед/мл), ре- тиновая кислота (50 мкг/мл)
30			1				Глутамин 3,9 Е-6, ФРН (10 ед./мл)
							Гиалуроновая кисло- та (10 мкг/мл), ин- гибитор трипсина (1 мкг/мл), глюко- за (0,25%), глута- мин 2,0 Е-6
							ФРН (5 мкг/мл), ви- тамин В ₁₂ (1,4 мкг/ мл), биотин (1 мкг/ мл), D,L-α-токо- ферол (10 мкг/мл), ретинол (5 мкг/мл), холин 1,0 Е-3, кар- нитин 1,0 Е-5, ли- нолевая кислота 1,0 Е-5, липоевая кислота 1,0 Е-6, микроэлементы
0,5		2					Тиролибери (1 нг/ мл), люлиберин (4 нг/мл) ПГЕ 100 нг/мл
0,03	20	1					Тироглобулин (100 мкг/мл)
			1,5 мкг/см ²				

Тип клеток	Первый автор	Основная среда	Инсулин, мкг/мл	Трансферрин, мкг/мл	Селенит, Е-9	ФРЭ, нг/мл	ФРФ, нг/мл	Гидрокортизон, Е-6	Дексаметазон, Е-6
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
19. Гепатоциты	Castell [30]	F12	0,06						0,01
20. Кардиомиоциты крысы	Kessler-Iceksen [31]	DME/F12	25	25				0,1	
21. Первичные мнблaстные кур	Dollenmeier [32]	MCDB201	5	10			300	10	
22. Клетки эпн-телня хру-сталнка бы-ка	Plouët [33]	199/F12 (1 : 1)	5	5		10			
23. Энтропoэ-тические клетки	Iscove [34]	IMDM		300					
24. Клетки энтролей-коза	Stewart [35]	HMEM(E) или α-MEM		300					
25. Т-лимфоци-ты	Iscove [34]	IMDM		+					5,0Е-5
26. В-лимфо-циты	Iscove [34]	IMDM		+					
27. Аднпоциты мышн (нз макрофа-гов)	Flesh [36]	DME	5	5	10				
28. Мононук-леары че-ловека	Schmitt [37]	RPMI1640							

Т ₃ , Е-9	Прогестерон, Е-9	Путресцин, Е-4	Фибронектин, мкг/мл	БСА, мг/мл	Этаноламин	Фосфоэтанол- амин	Дополнительные ком- поненты
11	12	13	14	15	16	17	18
			+	0,2%	2		Глюкагон 1,0 Е-6, по- верхность культу- ральной посуды по- крыта фибронекти- ном НЕРЕС 1,0 Е-2, фетуин (1 мг/мл)
			50				Глутамин 5,0 Е-3, β-оксипутират 5,0 Е-4, СоСl ₂ 1,0 Е-7, глицерин 4,0 Е-2, биотин (1 мкг/мл), олеат (10 мкг/мл) Фактор роста, выде- ленный из глаза (10 мкг/мл)
				10			Fe ²⁺ 7,5 Е-6, олеи- новая кислота (9,2 мкг/мл), L-α- дипальмитониллеци- тин (12 мкг/мл), холестерин (12 мкг/ мл)
				10			Эритропоэтин (3 ед./ мл), СаСl ₂ 2,5 Е-4, холестерин (7,8 мкг/мл), α-тиогли- церин
				+			Липиды бобов сои (17 мкг/мл) (без холестерина)
				+			Липиды бобов сои (50 мкг/мл) (без холестерина)
				0,1%			Глюкоза (4,5 г/л), пируват 1,0 Е-9, NaHCO ₃ (3,7 м/г/л), линолевая кислота 16 Е-9, суперна- тант L-клеток 30% Очищенный сыворо- точный альбумин человека (2,5— 10 мг/мл)

Тип клеток	Первый автор	Основная среда	Инсулин, мкг/мл	Трансферрин, мкг/мл	Селенит, Е-9	ФРЭ, нг/мл	ФРФ, нг/мл	Гидрокортизон, Е-6	Дексаметазон, Е-6
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Трансформированные (опухолевые) клетки

29. Клетки гибридомы	Kawamoto [38]	RPMI/ /DME/F12 (2:1:1)	10	10	1				
30. Линии гибридомы/миеломы	Cleveland [16]	IMDM/F12 (1:1)							
31. Линии гибридомы/миеломы	Fazekas de St. Groth [39]	IMDM		33					
32. Линии Т-лимфоидных клеток человека	Uittenboogaart [40]	IMDM		1					
33. Аденокарцинома легких человека	Masui [41]	DME/F12 (1:1)	10	10	25	2			0,05
34. Мелкоклеточная карцинома легких человека	Carney [42]	RPMI1640	5	100	30				0,01
35. Эпидермоидная карцинома легких человека	Masui [41]	DME/F12 (1:1)	5		25				
36. Линия карциномы предстательной железы человека	Kaighn [43]	DME/F12 (1:1)	2	2	1	25		0,05	
37. Нейробластома мыши (C-1300)	Agy [44]	MCDB411	1						

Т ₃ , Е-9	Прогестерон, Е-9	Путресцин, Е-4	Фибронектин, мкг/мл	БСА, мг/мл	Этаноламин	Фосфоэтанол- амин	Дополнительные ком- поненты
11	12	13	14	15	16	17	18

0,5	10 нг/мл			1,2			2-Меркаптоэтанол 1,0 Е-5, 2-аминоэтанол 1,0 Е-5, липопро- теин низкой плотно- сти человека (1— 2 мкг/мл), олеино- вая кислота (4 мкг/ мл в комплексе с делипидированным БСА) (2 : 1)
				0,4			α-Тиоглицерин (6 ил/ мл), микроэлемен- ты МСДВ 104 в половинной кон- центрации микро- элементов МСДВ 301
							Липиды бобов сои (24 мкг/мл)
							Глутамин (0,3 мг/мл)
							Эстрадиол 1,0 Е-8, селективный рост опухолевых клеток
							Глюкагон (0,2 мкг/мл).
							Глюкагон (0,2 мкг/мл), ас- корбиновая кислота 57 Е-6

Тип клеток	Первый автор	Основная среда	Инеулин, мг/мл	Трансферрин, мкг/мл	Селенит, Е-9	ФРЭ, нг/мл	ФРФ, нг/мл	Гидрокортизон, Е-6	Дексаметазон, Е-6
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
38. Карцинома толстой кишки человека	van der Bosch [45]	DME/F12 (1 : 1)	2	2	5	20			
39. Карцинома молочной железы человека (MCF-7)	Briand [46]	DME/F12 (1 : 1)	0,25	25	10	100			
40. Линия клеток опухоли гипофиза (GH ₃)	Bottenstein и др. [3]	F12	5	5			1		
41. Нейробластома крыс (B104)	Bottenstein и др. [3]	DME/F12 (1 : 1)	5	5	30				
42. Линия клеток меланомы (M2)	Battenstein и др. [3]	DME/F12 (1 : 1)	5	5	100				
43. Линия клеток яичников китайского хомячка	Hamilton [47]	MCDB301							
44. Линии клеток почки	Maciag [48]	DME/F12	5	5		10	50		

Сокращения. БСА — бычий сывороточный альбумин; МЕМ — минимальная среда Иг-ГМДМ — модифицированная Исковым среда Дюльбекко; ФРСТ — фактор роста синтеза АСР — стимулирующая размножение активность; ФРН — фактор роста нервов; ФРЭ — Т₃ — триодтиронин.

2.1.4. Транспортные белки

Сыворотка является также источником некоторых, так называемых транспортных белков, роль которых заключается в переносе незаменимых низкомолекулярных факторов. Альбумин среди прочих факторов переносит витамины, липиды (жирные кислоты, холестерин) и гормоны. Насыщенный желе-

Продолжение

Т ₃ , Е-9	Прогестерон, Е-9	Путресцин, Е-4	Фибринектин, ИКТ/мл	БСА, мг/мл	Этаиноламин	Фосфотанол-амин	Дополнительные компоненты
11	12	13	14	15	16	17	18
0,2							
3.0 Е-11							Глутамин 2,0 Е-3, поверхность куль- туральной посуды покрыта коллаген- ом типа IV Соматомедин С (1 иг/мл), тироли- берии (1 иг/мл), паратгормон (0,5 иг/мл)
	2,0 Е-8	1,0					
	1						Люлиберии (10 иг/мл), ФРН (10 иг/мл), фолли- кулостимулирую- щий гормон (40 мкг/мл)
			5	1			

ла; ДМЕ — МЕМ в модификации Дюльбекко; НМЕМ — МЕ с соевым буфером Хэнкса; ругеый тромбоцитами.

фактор роста эпидермиса; ФРФ — фактор роста фибробластов; ПГ — простагландины;

зом трансферрин незаменим для большинства культивируемых клеток, которые несут на своей поверхности специфические рецепторы для этого белка.

2.1.5. Липиды

Сыворотка является богатым источником различных липидов, необходимых культивируемым клеткам для выживания и роста. Линии клеток различаются по потребности в незаме-

мых жирных кислотах, фосфолипидах, лецитине и холестерине. Так, например, оптимальный баланс жирных кислот и холестерина варьирует в значительных пределах для различных линий кроветворных клеток и для одной и той же линии на разных стадиях созревания [11]. Было показано, что простагландины (ПГ) E и E_{2α} вовлечены в регуляцию клеточной пролиферации и действуют совместно с ростовыми факторами, такими как ФРЭ.

2.1.6. Минеральные вещества

Роль присутствующих в сыворотке неорганических микроэлементов (Cu, Zn, Co, Mn, Mo, Va, Se) выяснена далеко не полностью, но многие из них могут быть кофакторами ферментов. Так, например, ионы SeO_3^{2-} требуются для активации ряда ферментов метаболической детоксикации. Ионы селена могут также участвовать в инактивации свободных радикалов.

2.2. Возможные преимущества использования бессывороточных сред и сред с низким содержанием сыворотки

Использование таких сред обеспечивает следующие преимущества:

- I. улучшение воспроизводимости результатов опытов на пассируемых культурах вследствие большей стабильности состава среды (свойства сыворотки могут меняться от партии к партии);
- II. снижение риска заражения культуры вирусами, грибами, микоплазмой;
- III. снижение стоимости (особенно в случае эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота);
- IV. облегчение очистки продуктов клеточного метаболизма;
- V. снижение влияния дополнительных белков на результаты биологических исследований;
- VI. отсутствие цитотоксичности сыворотки;
- VII. предотвращение многослойного роста фибробластов в первичной культуре;
- VIII. селективное культивирование дифференцированных и функционально различающихся типов клеток из гетерогенной популяции первичной культуры без преимущественной стимуляции отдельных субпопуляций.

2.3. Некоторые недостатки использования сыворотки при культивировании клеток

Несмотря на сказанное выше, культивирование клеток в присутствии сыворотки обнаруживает ряд недостатков.

- I. Для большинства клеток сыворотка не является физиоло-

гической жидкостью, с которой они контактировали в исходной ткани. Такой контакт мог осуществляться, однако, в процессах заживления ран и образования кровяных сгустков; при этом сыворотка вызывает рост фибробластов, но тормозит рост эпидермальных кератиноцитов [7].

- II. Часто недооценивается возможность цитотоксичности сыворотки. Помимо селективных ингибиторов, бактериальных токсинов и липидов сыворотка может содержать полиаминоксидазу. Фермент действует на полиамины (спермин, спермидин), являющиеся продуктами секреции быстро пролиферирующих клеток, в результате чего образуются цитотоксические полиаминоальдегиды [12]. Эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота и сыворотка беременных женщин в отличие от лошадиной сыворотки содержат относительно много этого фермента. Этим можно объяснить результаты исследований, в которых было показано супрессивное действие эмбриональной сыворотки и сыворотки беременных женщин.
- III. Значительные изменения свойств сыворотки от партии к партии делают необходимым тщательный скрининг сывороток, что занимает много времени и дорого обходится.
- IV. Сыворотки могут содержать недостаточное количество специфических для данных клеток ростовых факторов, что приводит к необходимости добавления этих факторов к культурам клеток.

2.4. Возможные недостатки использования бессывороточных сред

- I. Использование таких сред дает во многих случаях большую экономию, но необходимость добавления в среду гормонов и ростовых факторов может сделать бессывороточную среду такой же дорогой, как и среда с сывороткой.
- II. Бессывороточная среда часто бывает пригодной лишь для одного типа клеток, так что при работе с несколькими линиями может возникнуть необходимость в разных вариантах бессывороточных сред.

2.5. Для чего нужна бессывороточная среда?

Каждый, кто использует культуру клеток в обычных лабораторных масштабах и нуждается в строгом контроле условий культивирования, может использовать бессывороточную среду, чтобы избежать вариативности в количестве различных неидентифицированных компонентов в сыворотке.

Существуют две главные причины использования бессывороточных сред при работе с большим количеством клеток, на-

пример с гибридами, продуцирующими моноклональные антитела, с фибробластами, синтезирующими интерферон, и с лимфомами, секретирующими лимфокины и другие факторы. Эти причины: а) необходимость избежать присутствия чужеродного белка, от которого в противном случае придется очищать получаемый продукт и б) высокая стоимость эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота.

3. Замена сыворотки в среде

3.1. Общий подход

В настоящее время исследования по замещению сыворотки в культурах клеток развиваются по трем различным направлениям.

I. *Аналитический подход*. Выделение и идентификация сывороточных факторов, требующихся для выживания и роста клеток. Это чрезвычайно трудоемкая и зачастую бесперспективная задача, поскольку большинство гормональных факторов действует синергически и присутствует в сыворотке в минимальных количествах.

II. *Синтетический подход Сато с сотрудниками* [4]. Добавление в основную питательную среду различных комбинаций ростовых факторов, выполняющих функцию сыворотки: специфических и неспецифических для клеток гормонов (включая митогены), транспортных белков и факторов прикрепления и распластывания.

III. *Метод, предложенный Хэмом с сотрудниками* [2]. Метод основан на постепенном снижении концентрации сыворотки до остановки клеточной пролиферации. Затем концентрация каждого компонента питательной среды (витаминов, аминокислот, гормонов и т. п.) подбирается таким образом, чтобы размножение клеток возобновилось. Более подробное описание этого подхода приведено в публикациях Хэма с сотрудниками [2, 7].

3.2. Факторы, рассматриваемые перед выбором среды

3.2.1. Нормальные и трансформированные клетки

Исследователь, желающий получить культуру клеток в химически определенной бессывороточной среде, в первую очередь должен определить, к какой категории относятся культивируемые клетки:

I. Нетрансформированные (нормальные) или трансформированные?

II. Предназначена культура для выживания или для роста?

III. Гомогенна или гетерогенна клеточная популяция (например, смесь эпителиальных клеток с фибробластами)?

IV. Исследуется дифференцировка или пролиферация?

При ответе на эти вопросы удобно пользоваться нижеприведенными формулировками, хотя следует иметь в виду, что перечисленные свойства не являются основными для каждой категории, поскольку стираются границы определений, встречаются и исключения из правил.

Нормальные, нетрансформированные клетки. Клетки, подобные таковым в интактном здоровом органе; отсутствие опухолеродности; эуплоидный (преимущественно диплоидный) кариотип; старение в культуре после ограниченного числа генераций.

Трансформированные клетки. Злокачественность, анеуплоидный кариотип, отсутствие зависимого от плотности торможения роста в культуре, потеря зависимости от субстрата, опухолеродность (факультативная), пониженная потребность в сыворотке, неограниченная продолжительность жизни.

Выживание. Поддержание жизнеспособности, морфологии; способность к метаболизму (факультативная) и потенциальная способность к дифференцировке.

Рост. Пролиферация или размножение клеток.

Обычно клетки из первичных эксплантатов здоровых тканей проявляют себя как нетрансформированные в течение первых генераций после выделения. Некоторые клетки остаются такими в течение 50 генераций и более. Такие нормальные клетки требуют обязательного присутствия в определенных количествах высокомолекулярных белков, гормонов и факторов роста даже при культивировании в улучшенных средах. Трансформированные клетки могут расти без ростовых факторов при условии обеспечения незаменимыми неспецифическими добавками. Появляется все больше данных о том, что опухолевые клетки способны стимулировать собственную пролиферацию, продуцируя аутокринные ростовые факторы.

3.2.2. Потребности нетрансформированных клеток

Культивируемые нетрансформированные клетки характеризуются потребностью в следующих факторах:

I. *Факторы, не являющиеся специфическими для какого-либо типа клеток.* Среди прочих сюда относятся: неорганические ионы (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-}), CO_2 , O_2 , pH, осмоляльность, температура, наличие углеводов, нуклеозидов, незаменимых аминокислот, витаминов, неорганических микроэлементов (включая селенит), инсулина, трансферрина, глюкокортикоидов и, возможно, соматомединов и инсулино-подобных ростовых факторов (ИРФ).

II. *Факторы с некоторой (но не абсолютной) клеточной специфичностью.* Примерами таких факторов могут служить ФРЭ, ФРФ, фактор роста нервов (ФРН), ФРСТ и гематопозитические ростовые факторы (колониестимулирующие факторы, интерлейкины).

Более того, оказалось, что некоторые факторы могут проявлять различные функции. Так, например, инсулин оказывается необходимым как для пролиферации, так и для дифференцировки.

3.2.3. Адгезия клеток к субстрату и биоматрикс [6]

Для пролиферации большинства типов нетрансформированных клеток необходимо их предварительное прикрепление к твердому субстрату. Взаимодействие таких клеток со своим окружением определяет многие клеточные свойства. Кроме кроветворных клеток только трансформированные клетки способны размножаться без прикрепления к субстрату.

I. *Субстраты.* Подходящими субстратами для адгезии клеток могут служить поверхности стекла или специально обработанных пластических материалов, так называемые пластики для культуры ткани с модифицированным поверхностным зарядом. Тем не менее для роста и дифференцировки некоторых клеток, особенно эпителиальных клеток и нейронов, более удачным субстратом оказывается коллаген. Коллаген является главным компонентом внеклеточного матрикса, к которому прикрепляются клетки. Клетки связываются с субстратами не непосредственно, а с участием факторов адгезии. Наиболее распространенным и хорошо изученным фактором адгезии является фибронектин — белок, содержащийся в плазме и сыворотке. Фибронектин связывается с различными субстратами, а клетки прикрепляются к этому фактору с помощью специфических рецепторов фибронектина. Известны и другие факторы адгезии, такие как хондронектин, обеспечивающий адгезию хондроцитов, и ламинин, участвующий в адгезии эпителиальных клеток. Некоторые типы клеток способны синтезировать коллаген, ламинин, гликозаминогликаны и гликопротеины *in vitro*, формируя таким образом собственный внеклеточный матрикс. Внеклеточный матрикс в форме биоматрикса может быть выделен из различных тканей и добавлен к культуральным флаконам или чашкам. Недавно было показано [14], что связывающая активность фибронектина обусловлена тетрапептидом Arg-Gly-Asp-Ser, являющимся частью домена, связывающегося с клетками.

В гл. 6 будут рассмотрены методы покрытия пластиков для культуры ткани поли-D-лизином, коллагеном или фибронектином.

II. Влияние субстрата на клетки. Субстрат играет важную роль в поддержании нормальных клеточных функций. Изолированные гепатоциты выживают на пластике в течение только одной недели, тогда как на коллагене они могут сохранять жизнеспособность вплоть до месяца. На биоматриксе гепатоциты могут выживать в течение 6 мес и более. При культивировании клеток на пластике обнаруживается их тенденция к дедифференцировке, что проявляется в изменении морфологии. Так, эпителиальные клетки в этих условиях приобретают фибробластоподобную форму и начинают синтезировать белки, специфичные для фибробластов. Культивирование клеток на коллагене или биоматриксе поддерживает начальную дифференцировку и снижает необходимость добавления различных ростовых факторов или сыворотки.

3.2.4. Тесты для определения оптимальной среды

Сложные ростовые потребности большинства клеток млекопитающих создают определенные проблемы в оценке адекватности тест-систем, используемых для определения оптимальных ростовых сред. Более подробно эта проблема рассмотрена в обзоре Хэма [7]. Как правило, длительные (в течение нескольких суток) тесты на размножение клеток предпочтительнее, чем короткие тесты с включением ^3H -тимидина при оценке клеточной пролиферации, поскольку известен ряд артефактов, стимулирующих пролиферацию клеток [15]. Тем не менее метод оценки включения ^3H -тимидина часто используется для скрининга, но полученные результаты следует проверять с помощью теста на эффективность клонирования или просто путем подсчета клеток.

3.2.5. Среда для бессывороточных культур клеток или культур с низкой концентрацией сыворотки

В последние три десятилетия было разработано немало химически определенных сред, основанных на минимальной среде Игла (MEM). К их числу относятся MEM в модификации Дюльбекко (DME) и более сложные среды, такие как среда Ham F12, среды CMRL 1066, RPMI 1640, среда McCoy 5A и модифицированная Исковым среда Дюльбекко (IMDM). Все эти среды в настоящее время поставляются соответствующими фирмами, и состав этих сред можно узнать, воспользовавшись каталогами этих фирм. При составлении среды для бессывороточной культуры часто используют смесь DME и F12 в соотношении 1:1 (по объему), что позволяет объединить качественное богатство среды F12 (микроэлементы, повышенное содержание витаминов) с более высокой концентрацией питательных веществ среды DME. Для культивирования кроветворных клеток, включая гибридомы, весьма удобной представляется среда

IMDM, дополненная трансферрином, сывороточным альбумином и некоторыми липидами. Другие клетки крови, включая лейкозные клетки, успешно растут в среде RPMI 1640. Среда CMRL 1066 особенно богата нуклеозидами и некоторыми витаминами. Среды серии MCDB разработаны Хэмом с сотрудниками специально для культивирования нормальных клеток.

Наиболее часто используемые среды могут быть систематизированы следующим образом (2):

- I. среды для постоянных линий с небольшими добавками сыворотки или белков: MEM, DME, α -MEM, среда McCoys 5A RPMI 1640;
- II. среды для постоянных линий с добавлением очищенных белков или гормонов: F10, F12, DME;
- III. среды для постоянных линий в монослое без добавления белков: CMRL 1066, MCDB 411, DME;
- IV. среды для клонального роста постоянных линий без добавления белков: F12, MCDB 301, DME, IMDM;
- V. среды для нетрансформированных клеток: DME, IMDM, MCDB 104, 105, 202, 401 и 501.

Исследования, проведенные с многими клетками млекопитающих, выявили ткане- и видоспецифичность потребности этих клеток в гормонах и питательных веществах. Хондроциты и фибробласты требуют добавления в основную среду липидов, тогда как эпителиальные клетки в этом не нуждаются. Хондроциты растут в присутствии ФРФ, тогда как кератиноциты и эпителиальные клетки бронхов, молочной железы и предстательной железы требуют добавления ФРЭ. Для кератиноцитов и эпителиальных клеток бронхов требуется также присутствие в среде этаноламина и т. д. [8].

Некоторые среды обычно можно использовать для культивирования клеток различных видов [2], например среду 199, DME, F12K и MCDB 202. Тем не менее для клеток индивидуальных видов предпочтительно использовать следующие среды:

- I. для клеток обезьяны и человека: среда 199, среда McCoys 5A, RPMI 1640, CMRL 1969, MCDB 104 и MCDB 202;
- II. для клеток крысы и кролика: среда McCoys 5A, F12 и MCDB 104;
- III. для нетрансформированных клеток мыши: DME, CMRL 1415, MCDB 202 и MCDB 401;
- IV. для куриных клеток; среда 199, DME, F12K и MCDB 202.

3.2.6. Выбор гормонов и ростовых факторов

Как следует из приведенного обсуждения и из результатов анализа табл. 2.2, большинство бессывороточных сред включает в себя инсулин, трансферрин и селениты. Инсулин добавляется в среду в относительно высокой концентрации (1—10 мкг/мл),

поскольку в обычной бессывороточной среде он быстро теряет свою биологическую активность. Инсулин может также имитировать действие родственных пептидов вследствие наличия гомологичных аминокислотных последовательностей с ИРФ и соматомединами. Трансферрин должен добавляться в культуру насыщенными ионами Fe^{2+} . Среди микроэлементов селениты играют особую роль благодаря их способности активировать глутатионредуктазу — ключевой фермент в метаболизме O_2 , а следовательно, в энергетическом метаболизме клеток. Глюкокортикоиды увеличивают эффективность клонирования глиальных клеток, фибробластов, хондроцитов, кератиноцитов и эпителиальных клеток бронхов, молочной и предстательной желез. Экзокринные клетки могут также требовать присутствия в среде специфических гормонов (например, эстрогена, пролактина и прогестерона для клеток молочной железы). Для некоторых клеток оказывается полезным добавление в среду трииодтиронина, а ФРЭ часто добавляется в культуры многих различных типов эпителиальных клеток.

В целом в настоящее время невозможно установить общие принципы составления универсальной бессывороточной среды. Во многих случаях метод проб и ошибок является единственным методом подбора ингредиентов для оптимальной среды. Как уже говорилось, оптимальной исходной средой для монослойной культуры является смесь DME и F12 в соотношении 1:1 с добавлением инсулина (5 мкг/мл), трансферрина (5 мкг/мл), селенита (30 нМ), ФРЭ (25 нг/мл), альбумина (1 мг/мл). Систематическое удаление одного из компонентов может помочь идентифицировать незаменимый фактор или факторы. Предложенный Хэмом [7] метод составления среды по лимитирующему фактору может в ряде случаев привести к выбору оптимальной концентрации незаменимого компонента. Однако этот «лобовой» подход требует много времени и перебора большого количества вариантов.

На начальных стадиях отбора удобно воспользоваться списком 44 бессывороточных культуральных сред с различными добавками, приведенным в табл. 2.2. Для начала следует выбрать среду, близкую по составу к той, на которой хорошо росли аналогичные клетки. Следует помнить, что среда, составленная для данного типа клеток, может, как правило, обеспечивать рост другой линии клеток или первичной культуры клеток другого происхождения при условии, что все эти клетки относятся к одному и тому же типу.

3.2.7. Значение микроэлементов

Роль микроэлементов трудно переоценить. Недавно Кливленд с сотрудниками [16] сообщили, что им удалось избежать добавления инсулина, трансферрина, БСА и липосом в бессыво-

роточную среду гибридом благодаря качественному расширению состава микроэлементов среды. В результате была получена среда, полностью свободная от белков и пептидов. Помимо обычных микроэлементов (в ионной форме) Fe, Cu, Mn, Si, Mo, V, Ni, Sn, Zn и Se они включили в среду также Al, Ag, Ba, Cd, Co, Cz, F, Ge, I, Rb и Zr. Возможность удаления из среды альбумина, трансферрина и инсулина авторы рассматривают как важный этап в развитии гибридомных исследований, поскольку эти белки являются возможным источником артефактов при использовании моноклональных антител для идентификации антигенов клеточной поверхности. При биотинилировании моноклональных антител для иммуофлуоресцентного обнаружения поверхностных антигенов наблюдается биотинилирование также инсулина и трансферрина, взаимодействующих со специфическими рецепторами. Более того, коммерческие препараты альбумина и трансферрина также часто содержат примеси иммуноглобулинов.

4. Практические советы для выбора среды и работы с ней

4.1. Общие правила и предостережения

- I. Должна быть уверенность в том, что в ходе приготовления среды и в процессе вашей работы с ней, не произойдет утраты или инактивации незаменимых питательных веществ и ростовых факторов.
 - а) Ионы Fe^{2+} могут окисляться до Fe^{3+} , преципитировать и теряться при стерилизации фильтрованием [7]. Поэтому добавляйте Fe^{2+} непосредственно перед стерилизацией среды.
 - б) Смешивание концентрированных растворов с Ca^{2+} и PO_4^{3-} может приводить к образованию осадка $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.
 - в) Высокие концентрации цистеина могут инактивировать инсулин, так что концентрация цистеина должна быть снижена до 10 мкМ. При невозможности следует добавить другой восстанавливающий агент (например, дитиотреитол или тиоглицерин).
 - г) Микроэмульсии и липосомы всегда готовьте перед употреблением. Ненасыщенные жирные кислоты могут окисляться; микроэмульсии и липосомы могут частично теряться при стерилизации среды фильтрованием. Проверьте цитотоксичность стабилизаторов липосом.
- II. Клетки в безбелковой среде более чувствительны к стрессовым воздействиям культивирования, чем клетки в среде с сывороткой [17]. Поэтому чаще пересеивайте клетки, растущие в бессывороточной среде.

- III. Не используйте для посева клетки в низкой концентрации (менее 10^4 клеток/мл), поскольку в таких условиях они могут не выжить.
- IV. Проверяйте условия культивирования: качество воды (бактериальные токсины, пирогены), состав газовой фазы (снижение концентрации O_2 может усилить рост клеток).
- V. При приготовлении среды используйте ингредиенты высшей степени очистки, поскольку даже минимальные примеси могут оказаться токсичными в отсутствие сыворотки. Случайные примеси могут оказать и благоприятное воздействие на рост клеток, но, оставаясь неидентифицированными, приведут к снижению воспроизводимости, особенно в случаях изменений партии используемых реагентов.
- VI. Для некоторых сложных сред (например, сред серии MCDB) следует создавать отдельные маточные растворы и объединять их непосредственно перед фильтрованием. Нестабильные маточные растворы (например, растворы глутамина и Fe^{2+}) следует хранить в замороженном виде и добавлять непосредственно перед использованием. В остальных случаях большинство стерилизованных компонентов среды в рабочей концентрации можно хранить при $4^\circ C$ в течение нескольких недель.
- VII. При использовании концентрированных маточных растворов следует обращать внимание на то, чтобы все компоненты оставались растворенными в течение стерилизации фильтрованием. Кроме того, при объединении нескольких концентрированных растворов, компоненты которых могут взаимодействовать между собой, следует производить медленное разведение до рабочей концентрации.

4.2. Стратегия оптимизации сред

Вы работаете с нетрансформированными клетками (а) или с трансформированными (б)? Если с (а), пользуйтесь стратегией А, а если с (б), пользуйтесь стратегией Б.

4.2.1. Стратегия А

- I. Для снижения стоимости исследований попытайтесь перейти от эмбриональной сыворотки к сыворотке новорожденных или взрослых телят, а далее к сыворотке лошади и человека.
- II. Если возможно, постепенно снижайте концентрацию сыворотки примерно до 2%, чтобы адаптировать клетки.
- III. Используйте субстрат, облегчающий прикрепление клеток, покрывая поверхность культуральной посуды (а) поли-D-лизином, (б) коллагеном или (в) фибронектином (см. разд. 6).

- IV. Выберите среду в соответствии с данными табл. 2.2. В первую очередь следует испытать среду, рекомендованную для клеток, близких к вашим. Добавьте ростовые факторы и гормоны, которые уже дали эффект с аналогичными клетками. Если такой среды нет, испытайте в первую очередь смесь сред DME и F12 в соотношении 1:1 с добавлением инсулина, трансферрина (насыщенного Fe^{2+}) и селенита в концентрациях 5 мкг/мл, 5 кмг/мл и 30 нМ соответственно.
- V. В случае плохого роста добавьте БСА в концентрации 1—5 мг/мл и/или смесь микроэлементов (коммерческий препарат) или смесь, описанную в работе [16]).
- VI. Проконтролируйте метод снятия клеток с субстрата при пересеве. Обработка неочищенным трипсином может оказаться неблагоприятной для ваших клеток. В этом случае используйте чистый кристаллический трипсин, но тщательно подберите его концентрацию, продолжительность и температуру обработки (вплоть до 4 °C) под контролем микроскопа. Действие трипсина останавливайте добавлением ингибитора трипсина (в возможно минимальном количестве). Вместо трипсина можно также использовать Диспазу (Тип I фирмы «Борингер»).
- VII. Попытайтесь снизить концентрацию БСА при одновременном добавлении в среду гормонов или ростовых факторов (среди прочих ФРЭ, соматомедины, глюкокортикоиды, трииодтиронин) и/или дополнительные микроэлементы.
- VIII. Если рост остается плохим, проверьте потребность ваших клеток в липидах. Для этого используйте микроэмульсии или липосомы, содержащие липиды сои, холестерин, линолевую кислоту, фосфатидилэтаноламин и другие липиды.
- IX. Дополнительные советы вы найдете в ссылках [1—9].

4.2.2. Стратегия Б

- I. Если клетки обнаруживают рост, зависимый от субстрата, следуйте этапам (I) и (II) стратегии А. Если рост клеток не зависит от субстрата, переходите к описанному ниже этапу (II).
- II. Выберите среду, руководствуясь указаниями табл. 2.2 для типов клеток, начиная с № 29. В первую очередь попробуйте среду, использованную с клетками, похожими на ваши. Добавьте ростовые факторы и гормоны, в которых нуждаются похожие клетки.
- III. Определите оптимальный размер инокулята (концентрация клеток при посеве). Начинать с концентрации около 10^5 клеток/мл. Поскольку опухолевые клетки обычно продуцируют собственные ростовые факторы, слишком малый размер инокулята может оказаться недостаточным для

обеспечения достаточной концентрации ростовых факторов.

IV. После проверки среды в соответствии с предложениями этапа (IV) стратегии А переходите к этапам (V), (VII) и (VIII) этой стратегии.

Для лейкозных клеток попробуйте использовать среды RPMI 1640 или CMRL 1066, смешивая их по необходимости со средой F12 в соотношении 1:1.

Помните, что культивируемые клетки должны отражать особенности своего происхождения, сохранять характерные свойства тканей, из которых они получены, проявлять признаки дифференцировки и пролиферации, которыми они обладали *in situ*. С некоторыми клетками эти цели могут быть достигнуты, но в случае других клеток следует учитывать ограничения возможностей существующих методов культуры ткани. Возможно также, что культивируемые клетки окажутся неспособными к одновременной пролиферации и экспрессии дифференцировочных функций. Следовательно, может потребоваться период размножения клеток, сопровождающийся периодом поддержания их в высокой плотности (более 10^5 клеток/см²), чтобы в клетках появились признаки дифференцировки.

5. Коммерческие препараты сред для оптимизации условий роста клеток млекопитающих

Можно выделить три категории сред, предлагаемых различными фирмами для оптимизации культур клеток млекопитающих (табл. 2.3).

I. *Среды с сывороточными добавками.* Клетки выращиваются в основной среде, содержащей небольшое количество сыворотки и обогащенной сывороточными добавками. Такие сывороточные добавки содержат обычно инсулин, трансферрин, селенит и ростовые факторы (чаще всего ФРЭ, ФРФ и ФРСТ); названия добавок: GF, ITS, GF-3, GF-9 и SerXtend.

II. *Среды с заменителями сыворотки.* Клетки выращиваются в основной питательной среде (например, смесь сред RPMI 1640/DME), в которую добавлены определенные заменители сыворотки. В состав заменителей обычно входят инсулин, трансферрин, ростовые факторы (большей частью ФРЭ, ФРФ, ФРСТ) и гормоны (как правило, гидрокортизон или дексаметазон, триодтиронин, прогестерон). Названия заменителей: Nutricyte, HCGS (Hybridoma Cell Growth Supplement); CLEX, Serum Plus, Nu-Serum.

III. *Бессывороточные среды.* Клетки растут без добавок в этих средах (например, смесь DME/F12 в соотношении 1:1 по объему), в состав которых обычно входят инсулин, трансферрин, селенит, частично альбумин (фракция V), фетуин, тестостерон,

Таблица 2.3. Коммерческие препараты бессывороточных сред и добавок

	Наименование	Поставщик
Сывороточные добавки	GF ITS SGF3 SGF9 SerXtend	Collaborative Research, BRL Collaborative Research Scotts Laboratories Scotts Laboratories NEN Research Products, Hana Media
Заменители сыворотки неизвестного состава	Nutricyte Nu-serum Ventrex Serum Plus CLEX	Brooks Laboratories Collaborative Research, BRL Ventrex Laboratories Inc. Dextran Products Ltd.
Заменители сыворотки известного состава	Selectakit HCGS Ultrosor-G	Gibco Biomedical Technologies LKB, IBF
Бессывороточные среды	HB101, HB102, HB103 SF1 HL-1 MEM IMDM KC-2000 Neuman & Tytell BM-86 (Wissler) MCDB 102 MCDB 103, 104	NEN Research Products, Hana Media Northumbria Biologicals Ventrex Laboratories, Paesel Scotts Laboratories Flow, Gibco, Sigma, Boehringer Mannheim, KC Biologicals KC Biologicals Gibco Boehringer Mannheim Gibco Flow Laboratories, Gibco

этаноламин, некоторые жирные кислоты, пируват, микроэлементы. Наименования: HB 101, HB 102, HL-1, DME, IMDM, KC-2000, BM-86 (Wissler).

6. Методы покрытия поверхности культуральной посуды биоматриксом

6.1. Покрытие поверхности культуральной посуды поли-D-лизином

При культивировании клеток, зависящих от субстрата, поверхность культуральной посуды часто покрывают положительно заряженным полимером (например, поли-D-лизином [2]).

- I. Растворите поли-D-лизин HBγ (мол. масса $3-7 \cdot 10^4$) в дистиллированной воде до концентрации 0,1 мг/мл и простерилизуйте (фильтрация через фильтр из ацетата целлюлозы с диаметром пор 0,22 мкм).
- II. Нанесите по 0,5 мл раствора в каждую чашку Петри 60×15 мм.
- III. Осторожно вращая чашку, распределите раствор равномерно по всей поверхности.

- IV. Через 5 мин полностью удалите раствор с помощью пастеровской пипетки.
- V. Промойте чашку 1,5 мл дистиллированной воды, осторожно ее вращая, и удалите воду пастеровской пипеткой.
- VI. Необходимо полностью удалить все растворы, поскольку свободный полилизин может оказывать цитотоксическое действие.
- VII. Чашки могут быть использованы сразу или после высушивания и хранения.
- VIII. Чашки, покрытые нестерильным раствором, могут быть стерилизованы путем ультрафиолетового облучения.

6.2. Выделение коллагена и покрытие поверхности культуральной посуды

Коллаген типа I может быть получен с помощью метода Строма и Микалопулоса [19] из сухожилий, связанных с позвонками хвоста крысы.

- I. Разрежьте свежевыделенные или замороженные и оттаявшие хвосты продольно от основания до конца.
- II. Удалите кожу и кровеносные сосуды.
- III. Возьмите белые коллагеновые волокна и простерилизуйте их ультрафиолетом.
- IV. Поместите 1 г коллагеновых волокон (из 3—4 хвостов) в 300 мл 0,1 М уксусной кислоты и поставьте перемешиваться при 4°C в течение 48 ч.
- V. Профильтруйте раствор через 2—3 слоя стерильной марли.
- VI. Разведите полученный раствор в 20 раз бидистиллированной водой.
- VII. Покройте раствором дно пластиковой чашки и высушите на воздухе (1—2 дня при температуре, не превышающей 37°C).
- VIII. Чашки можно хранить во влажной атмосфере при 4°C в течение нескольких месяцев.

Исходный маточный раствор коллагена может быть также нейтрализован и разведен культуральной средой. В этом случае коллаген образует гель благодаря повышенным значениям pH и концентрации солей. Денатурированный (высушенный на воздухе) коллаген облегчает прикрепление клеток (например, клеток эндотелия и скелетных мышц), а нативный (неденатурированный) коллаген может оказаться необходимым для правильной фенотипической экспрессии.

6.3. Покрытие поверхности культуральной посуды фибронектином

Фибронектин может быть получен по методу Обринка [18] из свежей плазмы человека, не обработанной гепарином, и в условиях подавления протеолитической активности фенилметил-

сульфонилфторидом. Можно использовать также коммерческие препараты фибронектина фирм BRL, Collaborative Research или Gibco. Фибронектин используется в количестве 1—5 мкг на 1 см² поверхности культуральной посуды.

- I. Растворите при осторожном помешивании 20 мкг лиофилизованного фибронектина в 1 мл бидистиллированной воды.
- II. Покройте полученным раствором дно чашки диаметром 35 мм и высушите на воздухе при 40°C.
- III. Тщательно промойте чашки дистиллированной водой и опять высушите на воздухе.
- IV. Готовые чашки можно хранить при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.

Литература

1. *Freshney R. I.* (1983). *Culture of Animal Cell — A Manual of Basic Technique*, Alan Liss, Inc., NY, p. 74.
2. *Ham R. G., McKeehan W. L.* (1979). in *Methods in Enzymology*, Vol. 53, Jacoby W. B., Pastan I. H. (eds.), Academic Press, NY, p. 44.
3. *Bottenstein J., Hayashi I., Hutshing S., Masui H., Mather J., McClure D. B., Ohasa S., Rizzino A., Sato G., Serrero G., Wolfe R., Wu R.* (1979). in *Methods in Enzymology*, Vol. 53: *Cell Culture*, Jacoby W. B., Pastan I. H. (eds.), Academic Press, NY, p. 94.
4. *Barnes D., Sato G.* (1980). *Anal. Biochem.*, **102**, 255.
5. *Barnes D., Sato G.* (1980). *Cell*, **22**, 649.
6. *Sato G. H., Pardee A. B., Sirbasku D. A.* (eds.) (1982). *Growth of Cell in Hormonally Defined Media*, Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif., Vol. 9, Book A and B, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
7. *Ham R. G.* (1981). in *Tissue Growth Factors*, Baserda R. (eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 57, p. 13.
8. *Ham R. G.* (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 16.
9. *Fischer G., Wieser R. J.* (eds.) (1983). *Hormonally Defined Media*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo.
10. *Brandshaw R. A., Rubin J. S.* (1980). *J. Supramol. Struct.*, **14**, 183. *Contr. Cell Div. Dev. Part A*: 193—209.
11. *Iscoe N.* (1982). *First Europ. Conf. Serum-Free Cell Culture*, Heidelberg.
12. *Ali-Osman F., Maurer H. R.* (1983). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **106**, 17.
13. *Bürk R. R.* (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, p. 57.
14. *Pierschbacher M. D., Ruoslahti E.* (1984). *Nature*, **309**, 30.
15. *Maurer H. R.* (1981). *Cell Tissue Kinetics*, **14**, 111.
16. *Cleveland W. L., Wood I., Erlanger B. F.* (1983). *J. Immunology Methods*, **56**, 221.
17. *McHugh Y. E., Walthall B. J., Steimer K. S.* (1983). *Biotechniques*, June/July, p. 72.
18. *Öbrink B.* (1982). In: *Methods in Enzymology*, Vol. 82, Cunningham L. W., Fredericksen D. W. (eds.), Academic Press, NY, p. 513.
19. *Strom S. C., Michalopoulos G.* (1982). in *Methods Enzymology*, Vol. 82, Cunningham L. W., Fredericksen D. W. (eds.), Academic Press, NY, p. 544.
20. *Clark J.* (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 6.
21. *McKeehan W. L., McKeehan K. A., Hammond S. L., Ham R. C.* (1977). *In vitro*, **13**, 399.

22. Jennings S. D., Ham R. G. (1981). In *Vitro*, 17, 238 (abstract No. 155).
23. Adolphe M., Ronot Z., Froger B., Corvol M. T., Forest N. (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg NY, Tokyo, p. 377.
24. Chaproniere-Rickenburg D. M., Weber M. M. (1982). Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif., 9, 1109.
25. Bunge R. P., Carey D. J., Higgins D., Eldridge C., Roufa D. (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 178.
26. Fischer G. (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 189.
27. Honegger P., Güntert B. (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 203.
28. Lang E., Lang K., Krause U., Racke K., Nitzgen B., Brunner G. (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 250.
29. Orly J., Wienberger-Ohana P., Farkash Y. (1983). In: *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 274.
30. Castell J. V., Gómez-Lechon M. D., Coloma J., Lopez P. (1983). In: *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 333.
31. Kessler-Icekson G., Wassermann L., Yoles E., Sampson S. R. (1983). In: *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 383.
32. Dollenmeier P., Eppenberger H. M. (1983). In: *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 358.
33. Plouët J., Oliuivé M., Courty J., Courtois Y., Barritault D. (1983). In: *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 123.
34. Iscove N. N., Melchers F. (1978). *J. Exp. Med.*, 147, 923.
35. Stewart S., Bi-de Zhu, Axelrad A. (1984). *Exp. Hematol.*, 12, 309.
36. Flesch I., Ketelsen U. P., Ferber E. (1983). In: *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 304.
37. Schmitt S., Schenkein H. A. (1983). *J. Immunol. Methods*, 63, 337.
38. Kawamoto T., Sato J. D., Le A., McClure D. B., Sato G. H. (1983). In: *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 310.
39. Fazekas de St. Groth S. F. (1983). *J. Immunol. Methods*, 57, 121.
40. Uittenbogaart C. H., Cantor Y., Fahey J. L. (1983). In *Vitro*, 19, 67.
41. Masui H., Miyazaki K., Sato G. H. (1983). In: *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 430.
42. Carney D. N., Bunn P. A., Jr., Gazdar A. F., Pagan J. A., Minna J. D. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3185.
43. Kaighn M. E. (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 418.
44. Agy P. C., Shipley G. D., Ham R. G. (1981). In *Vitro*, 17, 671.
45. van der Bosch J. (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 412.
46. Briand P., Lykkesfeldt A. E. (1983). in *Hormonally Defined Media*, Fischer G., Wieser R. J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, p. 436.
47. Hamilton W. G., Ham R. G. (1977). In *Vitro*, 13, 537.
48. Maciag T., Kelley B., Cerundolo J., Illsley S., Kelly P. R., Gaudreau J., Forand R. (1980). *Cell Biol. Int. Rep.* 4, p. 43.

НАРАЩИВАНИЕ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ В КУЛЬТУРЕ

Б. Гриффитс

1. Введение

На небольших культурах клеток, растущих, например, во флаконах до 1 л (площадь поверхности 175 см^2), удобно изучать морфологию клеток, сравнивать эффекты различных агентов или различных концентраций одного и того же агента на рост и метаболизм клеток. Существует, однако, множество экспериментальных задач, для выполнения которых требуется большое количество клеток. Примерами могут служить получение клеточных компонентов (из 10^9 клеток можно получить 7 мг ДНК), получение вирусов для производства вакцин (в общем случае $5 \cdot 10^{10}$ клеток на культуральный сосуд) или других клеточных продуктов (интерферон, активатор плазминогена, различные гормоны, ферменты и антитела), а также получение инокулятов для культур еще большего размера. Для получения большого количества клеток увеличение числа небольших культур оказывается делом утомительным, трудоемким и дорогостоящим. Естественным путем решения этой проблемы является увеличение размеров культуральной посуды, развитие системы «единичного (унитарного) процесса». К сожалению, масштаб культуры не растет пропорционально размерам культурального сосуда. По мере роста размера сосуда изменяются параметры роста клеток, что требует определенной модификации системы. Одной из задач данной главы является описание этих изменений, выявление масштабов культур, при которых они проявляются, а также рекомендации возможных путей решения возникающих при этом проблем. Речь будет идти как о клетках, растущих в суспензии, так и о клетках, способных расти только после прикрепления к субстрату (зависимые от субстрата клетки).

Суспензионная культура наиболее пригодна для получения большого количества клеток, поскольку выращивание клеток в литровом сосуде принципиально не отличается от выращивания в сосуде объемом 1000 л. Различия касаются лишь того, в какой степени следует контролировать условия окружающей среды и какими средствами поддерживать нужные для роста клеток физиологические условия. Увеличение объема суспензионных культур не требует принципиальных изменений конструкции сосудов. Масштаб однослойных культур (для клеток, зависимых от субстрата) очень трудно увеличивать в рамках унитарной

системы, поскольку при таком увеличении изменятся многие процессы и в соответствии с этим развиты различные системы культивирования большого количества клеток в монослое. Главной задачей является увеличение площади поверхности для роста клеток как относительно среды, так и относительно общего объема культуры.

Прежде чем перейти к детальному описанию методов культивирования в суспензии и в монослое и соответствующего оборудования, остановимся на некоторых общих аспектах культивирования клеток, многие из которых существенны для обеих систем.

2. Общие методы и параметры культур

Для увеличения размера клеточных культур необходимо знакомство с некоторыми биологическими концепциями и методами. При работе с небольшими культурами сохраняется известная «свобода для ошибок». Если культура погибнет, это будет досадно, но не катастрофично с точки зрения потери времени и денег. По мере того как масштаб культуры увеличивается, для ее поддержания требуется все больше ресурсов. Гибель культуры становится все более серьезным событием, и одновременно растут требования системы к более точному соблюдению всех условий культивирования. В этом разделе будет приведено описание всех главных компонентов систем культивирования клеток, на которые следует обращать особое внимание при увеличении масштабов культур и разнообразия конструкций и способов управления.

2.1. Определение количества клеток

Методы определения общего количества клеток (путем подсчета в гемоцитометре целых клеток или окрашенных ядер) и общей клеточной массы (путем определения сухого веса или количества белка) нетрудны. Сложнее получить правильное представление о жизнеспособности клеток, поскольку принятые методы либо повреждают клетки, либо используют специфические, но не обязательно типичные параметры физиологии клетки (см. гл. 8). Дополнительные трудности создаются тем, что во многих системах культивирования нельзя осуществить отбор проб (большинство культур клеток, зависящих от субстрата) или визуальное наблюдение, так что приходится прибегать к косвенным измерениям.

2.1.1. Жизнеспособность клеток

Исключение красителя. Метод основан на том, что живые клетки не могут захватывать некоторые красители, тогда как мертвые клетки проницаемы для них. Наиболее распространен-

ным красителем такого рода является трипановый синий (0,4%), но к числу его недостатков следует отнести способность окрашивать растворимые белки. Если клетки растут в среде с сывороткой, лучше использовать эритрозин В (0,4%) (см. гл. 4). Подсчет окрашенных и неокрашенных клеток проводится стандартным образом в гемоцитометре. Следует быть осторожным при интерпретации результатов, если окрашивание зависит от рН и концентрации; известны ситуации, при которых могут быть получены ложные результаты. Например, проницаемость мембран увеличивается в результате обработки клеток трипсином или при оттаивании замороженных клеток в присутствии диметилсульфоксида. Более подробно проблема определения жизнеспособности клеток будет рассмотрена в гл. 4 и 8.

2.1.2. Непрямые измерения

Непрямые измерения жизнеспособности клеток основаны на оценке их метаболической активности. Наиболее часто используемым параметром является утилизация глюкозы, а в качестве других параметров жизнеспособности могут быть также использованы поглощение кислорода, образование молочной и пировиноградной кислот, а кроме того, экспрессия ферментов. При логарифмическом росте клеток наблюдается очень тесная корреляция между утилизацией питательных веществ и числом клеток. Однако на других фазах роста культуры высокая скорость обмена, связанная не с ростом клеток, а с их жизнедеятельностью, может привести к получению ложных результатов. Результаты проведенных измерений можно выражать в форме выхода биомассы (Y) или в форме отношения удельной утилизации к скорости дыхания (Q):

$$\text{Выход биомассы (Y)} = \frac{\text{Концентрация биомассы (DX)}}{\text{Концентрация субстрата (DS)}} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{\text{Удельная утилизация/}}{\text{скорость дыхания}} &= \frac{\text{Концентрация субстрата (DS)}}{\text{Время (DT)} \times \text{клеточная масса/число клеток}} \\ (Q) & \quad (X) \end{aligned} \quad (2)$$

Типичные значения выхода биомассы для глюкозы (10^6 клеток/г) составляют 385 для клеток MRC-5, 620 для клеток Vero и 500 для клеток ВНК.

2.2. Оборудование и реагенты

2.2.1. Культуральные сосуды и их поверхности

Стандартным материалом многократного использования для выращивания животных клеток является стекло, хотя в более крупных культуральных сосудах оно заменяется на нержавеющей

щую сталь. Предпочтительнее использовать боросиликатные стекла (например, пирекс), поскольку они выщелачиваются слабее, чем натриевые. Главное, чтобы стеклянная посуда была чисто вымыта и по крайней мере трижды ополоснута деионизированной водой. Клетки легко прикрепляются к стеклу, но прикрепление может быть усилено при различных обработках поверхности (см. разд. 3.1). В суспензионной культуре прикрепление клеток нежелательно; для этого поверхности культуральных сосудов обрабатываются силиконовыми препаратами. Примерами могут служить Dow Corning 1107 (который прочно связывается со стеклом при нагревании) или диметилдихлорсилан (Repelcote, Hopkins and Williams), обработка которым требует последующего тщательного промывания сосудов в дистиллированной воде для удаления трихлорэтанового растворителя.

2.2.2. Соединительные трубки

По мере того как культуральные системы становятся более крупными и сложными, увеличивается и необходимость соединений различных блоков системы. Для таких соединений можно использовать комбинации трубок из силикона и нержавеющей стали. Силиконовые трубки обычно проницаемы для газов, что может стать источником проблем при использовании их для перекачки сред вследствие потери растворенного CO_2 . Они также подвержены быстрому износу при использовании в перистальтических насосах. Следует использовать толстостенные трубки с дополнительными усиливающими элементами (втулками). При соединении силиконовых трубок с трубками из нержавеющей стали закрепляйте участки соединения пластиковыми скобами для предотвращения разъединения в системе в процессе работы. Используйте силиконовые наконечники на концах трубок из нержавеющей стали, чтобы не поцарапать культуральные сосуды и избежать механического повреждения клеток.

2.2.3. Соединения

Часто возникает необходимость соединять несколько сосудов системы в ходе культивирования или же собирать систему после автоклавирования отдельных блоков. Соединение должно осуществляться в стерильных условиях, так что приобретение специализированных соединительных коннекторов, хотя и требует определенных затрат, но полностью себя оправдывает (например, линии, поставляемые LH Fermentation).

2.2.4. Отбор сред или клеточных суспензий

Необходимым условием культивирования клеток является обеспечение возможности частого и безопасного отбора проб культуры. Простейшее решение этой проблемы состоит в использовании вакцинных пробок, которые можно протыкать иглой шприца. Этот метод,

однако, пригоден только для небольших культур, и многократное протыкание может привести к нарушению стерильности культуры. Весьма удобным является использование устройств для отбора проб, таких как, например, поставляемые фирмой AVRI Pirbright, Surrey, UK) (рис. 3.1), поскольку такие устройства обеспечивают автоматическую очистку культуры от среды, содержащей мертвые клетки и, следовательно, избавляют от необходимости предварительного отбора выбрасываемых небольших начальных проб.

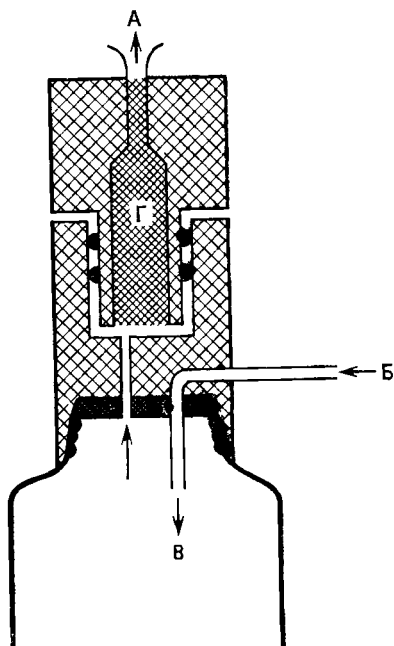


Рис. 3.1. Устройство для отбора проб, разработанное AVRI, Pirbright и поставляемое LH Fermentation. Воздух отсасывается через А (с помощью шприца), в результате чего среда уходит из культуры через Б в маленький сосуд В. Г представляет собой фильтр из хлопковой ваты.

метром пор 0,22 мкм. Примерами таких фильтров могут служить Microflow 50 и Pall Ultipor.

2.2.5. Фильтры

Воздушные фильтры необходимы для обеспечения вхождения и вывода газов. Даже при отсутствии постоянного газообмена один входной фильтр, как правило, необходим для уравнивания давления и для введения или удаления среды. Фильтры должны быть несмачиваемыми с диа-

2.2.6. Ингредиенты среды, не утилизирующиеся клетками

- I. Карбоксиметилцеллюлоза часто добавляется к среде до концентрации 0,1% для снижения механических повреждений клеток гидродинамическими силами, создаваемыми вращающимися мешалками. Соединения этого ряда лучше

растворимы, чем метилцеллюлоза, и обладают лучшей растворимостью при 4°C , чем при 37°C .

- II. Плуроник F-68 (полигликоль) (BASF Wyandot Corp. Inc., USA) часто добавляется в среды до концентрации 0,1% для снижения количества пены, образующейся в культурах в результате вращения мешалки или искусственной аэрации, особенно при использовании сывороток. Препарат предотвращает прикрепление клеток к стеклу благодаря сдавлению стимулирующего действия сыворотки на этот процесс.

2.3. Практические советы

- I. Всегда предварительно прогревайте среду до рабочей температуры (обычно 37°C) и стабилизируйте pH до добавления среды к клеткам. Сдвиги pH на начальных стадиях культивирования могут приводить к нежелательным последствиям, включая увеличение продолжительности лаг-фазы и снижение выхода клеток.
- II. Избегайте использовать в качестве инокулята клетки, находящиеся в стационарной фазе роста; это приводит к удлинению лаг-фазы и даже отсутствию роста. Идеально использовать для пересева клетки, находящиеся в конце логарифмической фазы.
- III. Всегда используйте достаточно высокую плотность клеток в инокуляте. Твердо установленное правило о минимальном количестве клеток в инокуляте, ниже которого они уже не будут расти, нет. Эта величина зависит от линии используемых клеток и состава среды. И все же минимально возможный размер инокулята варьирует в пределах от $5 \cdot 10^4$ до $2 \cdot 10^5$ клеток/мл или от $5 \cdot 10^3$ до $2 \cdot 10^4$ клеток/см².
- IV. Оптимальную скорость вращения мешалки для данного типа культурального сосуда и данной линии клеток подбирайте эмпирически. Для суспензионных культур скорость вращения может меняться от 100 до 500 об/мин, но оптимальная скорость составляет 200—350 об/мин. Для культур на микроносителях скорость вращения составляет 20—100 об/мин.
- V. Продуктивность культуральных систем зависит от качества и количества среды, а у клеток, зависящих от субстрата, и от площади поверхности, на которой могут расти клетки. Единица объема среды способна обеспечить ограниченный выход клеток. На величину этого выхода влияют следующие факторы: pH, ограничение доступа кислорода, накопление токсических продуктов, истощение питатель-

ных веществ, пространственные ограничения и механический стресс.

Как только один из этих факторов вступает в действие, рост клеток прекращается и ресурсы системы остаются неиспользованными. Поэтому задачей исследователя является задержка вступления в силу любого из этих факторов до тех пор, пока рост культуры не прекратится сам по себе. Приведем примеры путей достижения оптимального роста клеток: улучшение буферной системы (например, использование буфера HEPES

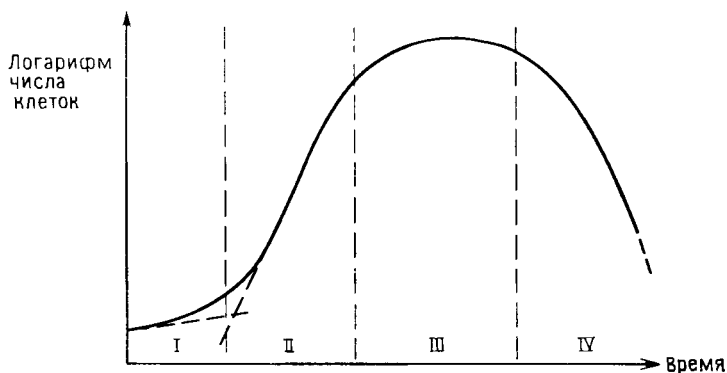


Рис. 3.2. Фазы роста культуры. I — лаг-фаза; II — фаза логарифмического роста; III — стационарная фаза; IV — фаза снижения количества клеток и гибель их.

вместо бикарбонатного); постоянный искусственный газообмен; увеличение свободного объема; использование вместо минимальных сред сложных сред с резервными добавками, такими как гидролизат лактальбумина, пептон и т. д.; введение перфузионных контуров, особенно с волокнистыми фильтрами и диализными трубками для детоксикации и т. д.

2.4. Кинетика роста

Стандартная кривая роста культуры начинается с лаг-фазы, за которой следуют фаза логарифмического роста, стационарная фаза и фаза снижения количества и гибели клеток (рис. 3.2). Такой характер роста подтвержден результатами многих исследований (см. гл. 1). Термин «рост клеток» обычно относят к увеличению их количества, хотя увеличение клеточной массы может происходить без репликации клеток. Различия в средней массе клетки оказываются весьма значительными при сравнении различных клеточных популяций, однако и в рамках одной популяции величина средней массы клетки может варьировать.

Рост (увеличение числа или массы клеток) может быть определен с помощью следующих выражений:

- а) Удельная скорость роста (μ ; скорость роста на единицу количества (веса или числа клеток) биомассы)

$$\mu = (1/x) (dx/dt) h^{-1} \quad (3)$$

где dx — увеличение массы клеток, dt — интервал времени и x — масса клеток.

Если скорость роста постоянна (например, в фазе логарифмического роста), то тогда

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (4)$$

где x_0 — вес биомассы в момент времени t_0 .

- б) Время удвоения (td); время, в течение которого происходит удвоение численности или массы популяции:

$$td = \ln 2 / \mu = 0,693 / \mu \quad (5)$$

- в) Скорость размножения (n) или число удвоений (т. е. количество случаев репликации инокулята)

$$n = 3,32 \log (x/x_0). \quad (6)$$

2.5. Среда и питательные вещества

Данная концентрация питательных веществ может поддерживать существование только определенного количества клеток. При истощении того или иного питательного вещества клетки часто могут использовать другие вещества, но на практике такой путь используется редко, поскольку он всегда сопровождается снижением скорости роста (например, при индукции альтернативных ферментов). Если минимальные среды, такие как МЕМ или основная базальная среда Игла, используются с сывороткой в качестве единственной добавки, то проблема истощения возникает скорее, чем при использовании полных сред (например, среды 199) или сред с добавками гидролизата лактальбумина, пептона или БСА (сред, включающих многие жирные кислоты). К питательным веществам, истощающимся в первую очередь, относится глутамин, частично вследствие его спонтанной циклизации до пирролидиноновой карбоновой кислоты, а также в результате ферментативного превращения (ферментами сыворотки и клетск) в глутаминовую кислоту, лейцин и изолейцин. Диплоидные клетки человека почти уникальны по интенсивной утилизации цистина. Многочисленные публикации об аргинине как лимитирующем факторе, по-видимому, ошибочны вследствие частого загрязнения клеток микоплазмой. Напомним, что то или иное питательное вещество перед истощением начинает тормозить рост клеток. По мере снижения концентрации аминокислот клеткам становится все труднее поддерживать достаточный внутриклеточный пул. Проблема

особенно обостряется в монослойной культуре, поскольку по мере увеличения плотности клеток в монослое снижается свободная поверхность клеток, доступная для вхождения питательных веществ [1].

Глюкоза часто оказывается другим лимитирующим фактором по мере ее катаболической утилизации клетками. Так что вместо добавления высоких концентраций глюкозы в начале культивирования предпочтительнее добавлять ее через 2—3 дня культивирования. Для поддержания в культуре некоторого

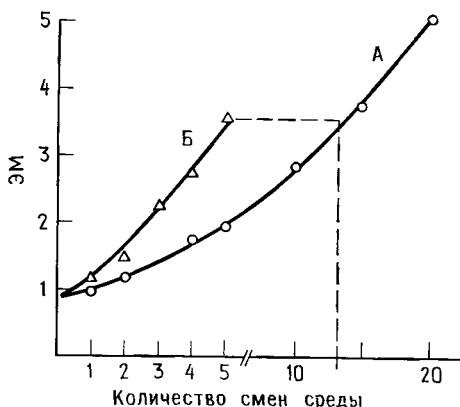


Рис. 3.3. Сравнение роста клеток MRC-5 при постоянной перфузии (А) или полных сменах среды (Б). В обеих системах использовался один и тот же объем сменяемой среды за сутки. Рост клеток представлен в эквивалентах монослоя (ЭМ); этим подчеркивается многослойный рост клеток MRC-5.

избытка питательных веществ нередко используется частичная или полная смена среды путем перфузии. На рис. 3.3 приведены результаты сравнительного анализа стимуляции роста клеток MRC-5 при добавлении одинаковых количеств среды либо путем постоянной перфузии (в течение 24 ч), либо путем смены среды. Эффективность смены среды обусловлена, по-видимому, создаваемыми при этом высокими внеклеточными концентрациями питательных веществ, стимулирующих последующие репликативные циклы. Как следует из этих данных, при использовании перфузии нужно быть уверенным, что скорость перфузии достаточно велика для оптимальных условий культивирования.

Многие типы клеток либо абсолютно зависят от добавления определенных факторов роста, либо достигают оптимального роста только в присутствии этих факторов (см. гл. 2).

В суспензионных культурах часто возникают проблемы, связанные с агрегацией клеток. В связи с этим для суспензионных

культур специально разработаны среды, лишенные магния и кальция (эти ионы влияют на прикрепление клеток) (см. разд. 3.1). Для устранения агрегации клеток можно добавлять в среду низкие концентрации трипсина (2 мкг/мл).

2.6. pH

Оптимальный pH среды должен быть близок к 7,4 в начале культивирования и не снижаться ниже 7,0 в ходе культивирования. Однако для многих линий гибридом оказывается предпочтительным pH около 7,0. При pH ниже 6,8, как правило, наблюдается подавление роста клеток. Среди факторов, влияющих на стабильность pH, следует отметить тип буфера и его емкость, объем воздушного пространства культуры и концентрацию глюкозы в среде.

Нормальной буферной системой в культуре ткани является система CO_2 -бикарбонат, аналогичная таковой в крови живых организмов. Это слабая буферная система со значением pK_a ниже физиологического оптимума. Эта буферная система требует также добавления CO_2 в воздушное пространство над средой для предотвращения потери CO_2 и накопления гидроксильных ионов. Буферная емкость среды повышается фосфатами, присутствующими в сбалансированных буферных солевых растворах. Среда, предназначенные для уравнивания 5%-ным CO_2 , содержат обычно солевой раствор Эрла (25 мМ NaHCO_3), хотя может быть использован и солевой раствор Хэнкса (4 мМ NaHCO_3) при уравнивании среды воздухом. Увеличение буферной емкости и стабильности pH культуральной среды достигается благодаря использованию цвиттерионных буферов [2], таких как HEPES (в концентрации 10—20 мМ), добавляемых к бикарбонатному буферу или заменяющих этот буфер. В последнем случае концентрация бикарбоната в среде снижается до 0,5 мМ. Другие буферные системы используются в специализированных средах, например в среде Лейбовича (L-15) [3]. Эти среды используют буферную емкость свободных аминокислот, глюкоза заменена в них на галактозу и пируват, и бикарбонат не включается в состав среды. Такие среды пригодны для культивирования клеток в незакупоренных сосудах.

Объем воздушной фазы в герметически закрытых культурах важен, поскольку на начальных стадиях культивирования 5%-ный CO_2 необходим для поддержания pH среды. Однако по мере роста клеток и генерации ими CO_2 воздушная фаза накапливает CO_2 и препятствует его диффузии из водной фазы. В результате в водной фазе накапливается слабо диссоциируемый NaHCO_3 , что сопровождается избыточным образованием ионов H^+ и снижением pH среды. Следовательно, для закупоренных культур требуется большой объем воздушной фазы,

обычно в 10 раз больший, чем объем среды (такой объем необходим также для адекватного снабжения культур кислородом). Такой большой объем воздушной фазы невозможен при увеличении размера культур, и в этих случаях необходимы открытые системы с искусственным током воздуха, входящего через один фильтр и выходящего через другой.

Метаболизм глюкозы в клетках приводит к накоплению пирувата и лактата. Глюкоза метаболизируется значительно быстрее, чем это нужно для поддержания роста. Следовательно, концентрация глюкозы в среде не должна превышать 2 г/л,

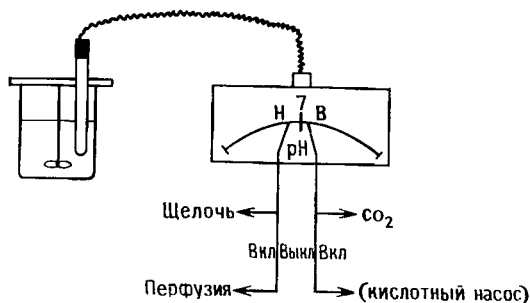


Рис. 3.4. Схема контроля pH в культуре клеток. Н — нижняя критическая точка и В — верхняя критическая точка на шкале pH.

и лучше добавлять глюкозу в среду в ходе культивирования, чем повышать начальную ее концентрацию. В качестве альтернативы можно заменять глюкозу на галактозу и фруктозу. При этом заметно снижается образование молочной кислоты, но одновременно, как правило, снижается и скорость роста культуры. Такая замена замедляет снижение значений pH среды и достаточна для поддержания небольших культур. По мере увеличения масштабов культуры происходит снижение объема газовой фазы и поверхности культуральной среды по отношению к ее объему. Кроме того, были созданы многочисленные системы с увеличенной поверхностью для роста клеток и увеличенной клеточной плотностью по отношению к объему культуры. В результате проблема pH возникает на более ранних стадиях культивирования, поскольку CO_2 удаляется менее эффективно и увеличение количества клеток приводит к увеличению образования молочной кислоты и CO_2 . Выходом из создавшегося положения является более частая смена среды или создание систем контроля pH.

Основы системы контроля pH приведены на рис. 3.4. Автоклавируемый электрод для измерения pH (поставляется фирмой Pye Ingold, Russell) передает сигнал на pH-метр, где он преобразуется в цифровую или аналоговую форму. Для конт-

роля рН следует установить максимальное и минимальное значения рН, ограничивающие рабочий диапазон поддержания рН культуры. При достижении этих ограничивающих значений рН включаются реле, запускающие насос или соленоидный клапан, и поступающие через них компоненты возвращают значения рН в рабочий диапазон. На рис. 3.4 показаны также наиболее употребительные агенты, применяемые для доведения рН. При равновесии среды с воздушной фазой увеличение рН выше максимального критического значения является достаточно редким событием, так что добавление кислоты не требуется. При необходимости добавления щелочи рекомендуется использовать бикарбонат натрия (5,5%). Гидрат окиси натрия (0,2 М) может быть использован только при высокой скорости перемешивания культуры, когда быстрое разведение препятствует повреждению клеток высокими локальными концентрациями щелочи или же при наличии перфузионного контура. Насосы для введения жидкости поставляются обычно как компонент рН-метра. Поступление в культуру газа контролируется соленоидным клапаном. В практической работе рекомендуется подавать 5%-ный CO_2 в культуру через соленоидный клапан, а 95%-ный воздух — непосредственно. При превышении максимального критического рН CO_2 будет смешиваться с воздухом, но ниже этого значения в культуру будет поступать только воздух. Это само по себе является контролирующим фактором, поскольку облегчает удаление CO_2 и обеспечивает культуру кислородом.

2.7. Кислород

Возможность увеличения масштаба культивирования клеток животных в значительной степени зависит от обеспечения культуры кислородом, не сопровождающимся повреждением клеток. Кислород растворяется в культуральной среде лишь до определенного предела (7,6 мкг/мл). Средняя скорость потребления клетками кислорода, судя по литературным данным [4], составляет 6 мкг/ 10^6 клеток/ч. Следовательно, в типичной культуре с концентрацией $2 \cdot 10^6$ клеток/мл истощение растворенного в среде кислорода (7,6 мкг/мл) произойдет менее чем за час. Необходимо, следовательно, поставлять кислород в среду в течение всего жизненного цикла культуры, и возможность адекватного решения этой проблемы зависит от скорости переноса кислорода (СПК) в системе:

$$\text{СПК} = K_1 a (C^* - C), \quad (7)$$

где СПК — количество переносимого O_2 /единица объема/единица времени; K_1 — коэффициент переноса кислорода; a — площадь поверхности, через которую осуществляется перенос кислорода (поскольку эта величина может быть измерена только

в стационарных и поверхностно аэрируемых культурах, обычно используют параметр K_{1a} , обладающий размерностью [объем/час] и представляющий собой коэффициент переноса массы); C^* — концентрация растворенного кислорода в среде при насыщении и C — действительная концентрация кислорода в данный момент времени.

При $C=0$ параметр K_{1a} (СПК/ C^*) имеет размерность $ч^{-1}$ и, следовательно, может служить показателем времени, необходимого для полной оксигенации данного культурального сосуда в данных экспериментальных условиях.

Аэрация культуры может быть достигнута с помощью одного из изложенных ниже методов либо их комбинации: поверхностная аэрация, пробулькивание, диффузия через мембраны, перфузия среды, увеличение парциального давления O_2 , увеличение атмосферного давления.

2.7.1. Поверхностная аэрация в статических культурах

В закрытых культуральных сосудах важным фактором является количество кислорода в системе и его доступность для клеток, растущих под 3—6-миллиметровым слоем среды. Обычно в статических культурах используется отношение объема газовой фазы к объему среды 10:1. При таком соотношении

Таблица 3.1. Концентрация кислорода в газовой и жидкой фазах культуральных сосудов P_y

Кислород в 900 $см^3$ воздуха:

$$900 \times 0,21 \times 32 / 22400 = 0,27 \text{ г}$$

Кислород в 100 мл среды

$$100 \times 7,6 \times 10^{-4} = 0,0076 \text{ г}$$

Примечания:

0,21

= концентрация кислорода в воздухе

32

= мол. масса кислорода

22400

= грамм-молекулярный объем

$7,6 \times 10^{-4}$

= растворимость кислорода в воде при 37 °C при равновесии с воздухом.

культуры оказываются в достаточной степени обеспечены кислородом. Так сосуды емкостью 1 л (например, флаконы P_y) с 900 $см^3$ воздуха и 100 $см^3$ среды содержат первоначально 0,2776 г кислорода (табл. 3.1). Этого количества кислорода хватает для поддержания 10^8 клеток в течение 450 ч, что вполне достаточно. Вторым фактором является доступность этого кислорода для клеток. Скорость транспорта кислорода из воздушной фазы в водную составляет, как было подсчитано, около 17 $мкг/см^2/ч$ [4]. Этого более чем достаточно для клеток, растущих в литровом сосуде. Однако если среда у поверхности

будет насыщена кислородом, а его концентрация у монослоя клеток близка к нулю, то скорость диффузии кислорода к клеткам, согласно закону Фика, составит около $1,5 \text{ мкг/см}^2/\text{ч}$. При такой скорости диффузии кислород обеспечивает поддержание около 50×10^8 клеток в литровом сосуде. Для многих исследователей, работающих с культурами клеток, такая плотность клеток вполне достаточна. Приведенные вычисления подчеркивают важность поддержания большого объема газовой фазы в статических закупоренных культурах, поскольку в ином случае кислородная недостаточность может стать одним из факторов, ограничивающим рост. Для более полного обсуждения этих вычислений, включая закон диффузии Фика, следует обратиться к обзору Спир и Гриффитса [4].

2.7.2. Поверхностная аэрация в перемешиваемых культурах

Перенос кислорода в перемешиваемых культурах зависит от скорости вращения и формы мешалки. Значение K_1a определяется экспериментальным путем [4], но обычно аэрация не превышает таковую, обеспечиваемую поверхностным захватом кислорода, если скорость вращения не больше 100 оборотов/мин. Поскольку скорость поступления кислорода зависит главным образом от поверхности культуральной среды, при увеличении масштабов культуры важно не превышать отношения глубины среды к диаметру 2:1, если не используются более эффективные системы аэрации.

2.7.3. Пробулькивание

Пропускание пузырьков газа через среду является чрезвычайно эффективным средством увеличения переноса кислорода (как было показано при ферментации у бактерий). Однако этот метод может быть опасен для клеток животных вследствие повреждающего действия пузырьков на клеточные мембраны из-за высокой поверхностной энергии. Повреждающее действие может быть снижено при использовании крупных пузырьков воздуха (которые характеризуются меньшей поверхностной энергией по сравнению с мелкими пузырьками) путем снижения скорости поступления воздуха (до $5 \text{ см}^3/\text{л/ч}$) и добавлением препарата плуроник F-68. В разд. 4.7 описан специальный метод пробулькивания (ферментер с воздушным лифтом), который может быть с успехом использован в больших одноблочных монослойных культурах (например, во флаконах с большой площадью поверхности). При использовании пробулькивания эффективность оксигенирования повышается в культуральных сосудах с высоким отношением высоты к диаметру, поскольку высокое давление у дна таких сосудов увеличивает растворимость кислорода.

2.7.4. Диффузия через мембраны

Силиконовые трубки весьма проницаемы для газов, и если культуральный сосуд снабдить длинными тонкостенными трубками, то можно добиться достаточной диффузии кислорода в культуру. Для этого, однако, требуются очень длинные трубки (например, для культуры объемом 1000 л требуются трубки длиной 30 м и диаметром 2,5 см). Этот метод дорог и неудобен в пользовании и, кроме того, создает неразрешимую проблему при увеличении масштабов культивирования, поскольку при этом происходят трехмерный рост культуры и только двумерный рост системы газообмена.

2.7.5. Перфузия среды

Система замкнутого перфузионного контура постоянно (или по сигналу) извлекает среду из культуры и пропускает ее через устройство для оксигенации, а затем возвращает в культуру. Этот метод обладает многими преимуществами, если легко отделять среду от клеток для пропускания через перфузионный контур. Среда в устройстве для оксигенации эффективно пробулькивается для насыщения кислородом и другими компонентами, такими, например, как NaOH для контроля pH, который может повреждать клетки, если его добавлять непосредственно в культуру. Этот метод используется в системах со стеклянными бусами (разд. 3.6.1) и оказывается особенно эффективным в системах с микроносителями (разд. 3.6.3).

2.7.6. Поступление из газовой фазы

Концентрация растворенного кислорода может быть повышена путем увеличения парциального давления кислорода в газовой фазе (от атмосферных 21% до любого значения в смеси кислорода с азотом) либо путем повышения давления в культуре на 1 атм (в этом случае увеличиваются растворимость кислорода и его диффузия). Эти методы могут быть использованы лишь в хорошо изученных культурах, поскольку следует опасаться токсических эффектов кислорода. И наконец, на величину скорости поступления кислорода может влиять форма лопастей мешалки.

2.7.7. Нарращивание культур клеток

Первым фактором, который обычно приходится преодолевать при увеличении массы культуры, является кислородная недостаточность. Это становится проблемой в обычных перемешиваемых культурах при объеме свыше 10 л. Однако при совре-

менном использовании культур с высокой плотностью клеток, поддерживаемых с помощью перфузии, кислородное голодание может происходить и в двухлитровых культурах. Для предсказания этапа, на котором может начаться кислородное голодание, можно использовать компьютерные модели, аналогичные предложенной Спиром и Гриффитсом [4]. Эти модели используют в качестве входных данных ростовые характеристики клеток (их тип, размер инокулята, продолжительность лаг-фазы и среднее время генерации) и характеристики системы культивирования (объем среды и газовой фазы, площадь поверхности, состав газовой смеси, давление). Программа предоставляет выбор метода аэрации (перечислены в разд. 2.7) как в перемешиваемой, так и в статической культурах. Баланс кислорода рассчитывается на 8-часовой интервал с получением величин выхода клеток и поступления и утилизации кислорода. Можно варьировать такие параметры оксигенирования, как скорость вращения мешалки и скорость тока воздуха при пробуюлькивании.

2.7.8. Редокс-потенциал

Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), или редокс-потенциал, является показателем заряда среды, и его величина, следовательно, определяется соотношением окисляющих и восстанавливающих химических соединений, концентрации кислорода и рН. При изготовлении свежей среды и помещении ее в культуральный сосуд требуется время для установления равновесного ОВП (процесс называется уравниванием). Оптимальный уровень ОВП для роста многих линий клеток составляет $+75$ мв, что соответствует значению pO_2 растворенного кислорода 8—10%. Некоторые исследователи предпочитают контролировать поступление кислорода в культуру с помощью окислительно-восстановительного, а не кислородного электрода. При прослеживании изменения ОВП с помощью редокс-электрода и рН-метра (с милливольтовой шкалой) можно получить данные о характере роста клеток [5]. Это связано с тем, что значение ОВП снижается в течение логарифмического роста клеток и достигает минимального значения примерно за 24 ч до наступления стационарной фазы (рис. 3.5). Такой способ оценки роста культуры является особенно эффективным, когда невозможно отбирать пробы клеток. Этот метод полезен также для предсказания момента окончания логарифмической фазы роста, чтобы смена среды, добавление вирусов или промоторов образования клеточных продуктов были произведены в оптимальное время. Влияние ОВП на клеточные культуры подробно рассмотрено Гриффитсом [6].

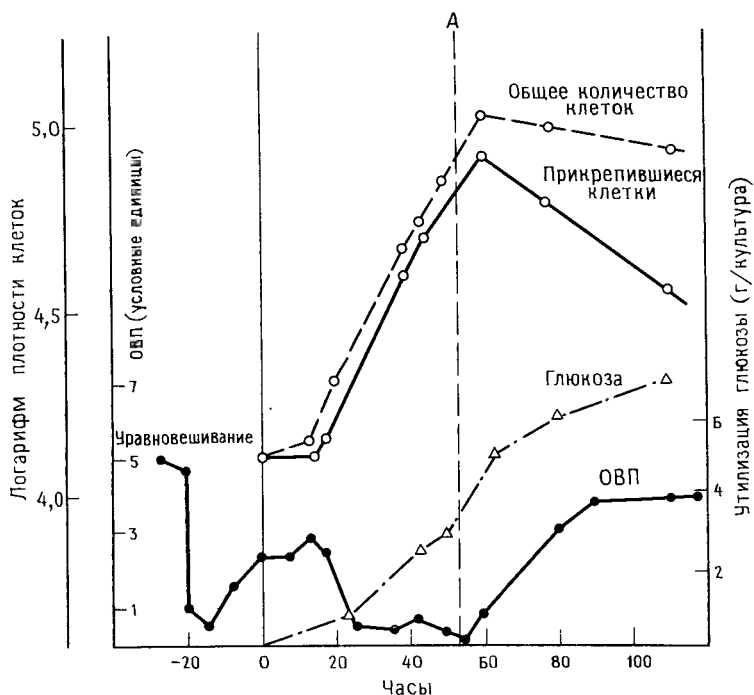


Рис. 3.5. Корреляция окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) с ростом клеток и поглощением глюкозы [6]. Минимальное значение ОВП достигается за 24 ч до окончания логарифмического роста клеток (А).

2.8. Типы культуральных систем

2.8.1. Непроточные культуры

Это обычный тип культур, в котором клетки вводят в фиксированный объем среды. По мере роста клеток происходит использование питательных веществ и накопление метаболитов. Среда, следовательно, должна постоянно сменяться, что в свою очередь приводит к изменению клеточного метаболизма, часто называемому физиологической дифференцировкой. Со временем пролиферация клеток прекращается вследствие истощения питательных веществ, накопления токсичных продуктов отходов и зависящего от плотности ограничения роста в монослойных культурах. Известны методы увеличения продолжительности жизни непроточных культур и, следовательно, увеличения выхода клеток путем различных способов «подкормки» субстратами.

а) Прерывистый (при этом определенная часть культуры заменяется равным объемом свежей среды).

- б) Постоянный (объем культуры увеличивается с постоянной низкой скоростью, а небольшие порции клеток периодически удаляются).
- в) Перфузионный (осуществляется постоянное поступление свежей среды в культуру и одновременное удаление равного объема использованной (бесклеточной) среды). Перфузия может быть открытой, когда из системы удаляется вся среда, и закрытой, когда удаляемая из культуры среда проходит через дополнительный сосуд и возвращается в культуральный сосуд. Дополнительный сосуд используется для «регенерации» среды путем ее аэрации и доведения рН.

Все системы непроточных культур характеризуются в той или иной степени накоплением отходов и непостоянством внешних условий. Эти системы пригодны для культивирования клеток как в монослое, так и в суспензии.

2.8.2. Проточные культуры

Эти системы обеспечивают истинные гомеостатические условия без изменений концентрации питательных веществ и метаболитов, а также числа клеток. Гомеостаз обусловлен постоянным вхождением среды в культуру и одновременным удалением равного объема среды с клетками. Поэтому такие системы пригодны только для суспензионных культур и монослойных культур на микроносителях. Подробнее о культурах с постоянным протоком будет сказано в разд. 4.6.

2.8.3. Выбор между непроточной и проточной культурами

Культуры с постоянным протоком представляют собой единственную систему, в которой все клетки гомогенны и могут сохранять гомогенность в течение длительного периода (месяцы). Это свойство имеет большое значение в физиологических исследованиях, однако такие культуры дороги для получения клеточных продуктов. Стоимость получения этих продуктов определяется затратой времени обслуживающего персонала, а также стоимостью среды и оборудования. При оценке стоимости следует также принимать во внимание сложность используемых оборудования и процессов, поскольку именно эти факторы определяют необходимую квалификацию персонала и влияют на надежность процесса производства продуктов. Непроточное культивирование — трудоемкий и дорогостоящий процесс, поскольку для каждого единичного сбора клеток требуется пересев и инкубация до получения конечной культуры. Определенный режим для непроточной культуры может обеспечить повтор-

ные, хотя и менее обильные сборы продукта, и чем дольше поддерживается культура в продуктивном состоянии, тем дешевле оказывается процесс получения продукта в целом. Однако для поддержания клеточной популяции на высоком уровне в течение достаточно продолжительного времени часто оказывается необходимым увеличение объемов среды, и если при этом необходимо использовать дорогостоящие ростовые факторы, то такой вариант перестает быть экономически выгодным. Поддержание высокого выхода клеток, а следовательно, высокой концентрации конечного продукта может оказаться необходимым для снижения стоимости всего процесса и перевесить, таким образом, увеличение стоимости среды. Культивирование клеток в постоянном протоке в хемостате не может обеспечить максимального выхода клеток, поскольку в этой системе действует фактор, ограничивающий рост клеток. Для получения максимального выхода клеток в этом типе культур следует использовать вариант турбидостата (см. разд. 4.6). Для некоторых практических применений, например получения цитопатических вирусов, не остается другого выбора, кроме использования непроточных культур.

3. Монослойные культуры

3.1. Введение

Флаконы и пробирки для культуры ткани, обеспечивающие поверхность роста 5—200 см², известны любому исследователю, работающему с культурами. Самыми большими стационарными флаконами, обычно используемыми в лаборатории, являются флаконы Ру или их пластиковые одноразовые аналоги. Эти сосуды обладают поверхностью для роста клеток 175—200 см² (в зависимости от типа сосуда), требуют для роста клеток 100—150 мл среды; объем газовой фазы составляет 750—1000 см³. В этих сосудах можно получать 2×10^7 диплоидных клеток и до 10^8 гетероплоидных клеток. При необходимости получения, например, 10^{10} клеток придется использовать более 100 одинаковых культур, так что все манипуляции с клетками придется воспроизводить не менее 100 раз. Кроме того, для поддержания роста такого количества культур потребуется термостат с рабочим объемом 100 л. Ясно, что настало время, когда для увеличения масштабов получения клеток следует использовать более эффективные культуральные системы. Для получения большого количества клеток, зависящих от субстрата, следует использовать более совершенную технику культивирования; это позволит более производительно использовать обслуживающий персонал, а также существенно повысить от-

ношение поверхности роста клеток к объему культуры. Для достижения этого был разработан весьма обширный и разнообразный набор типов культуральных сосудов и систем культивирования. Многие из этих систем схематически представлены на рис. 3.6 и будут обсуждены ниже. Наиболее перспективными следует считать методы, основанные на модификации системы суспензионной культуры, поскольку они обеспечивают

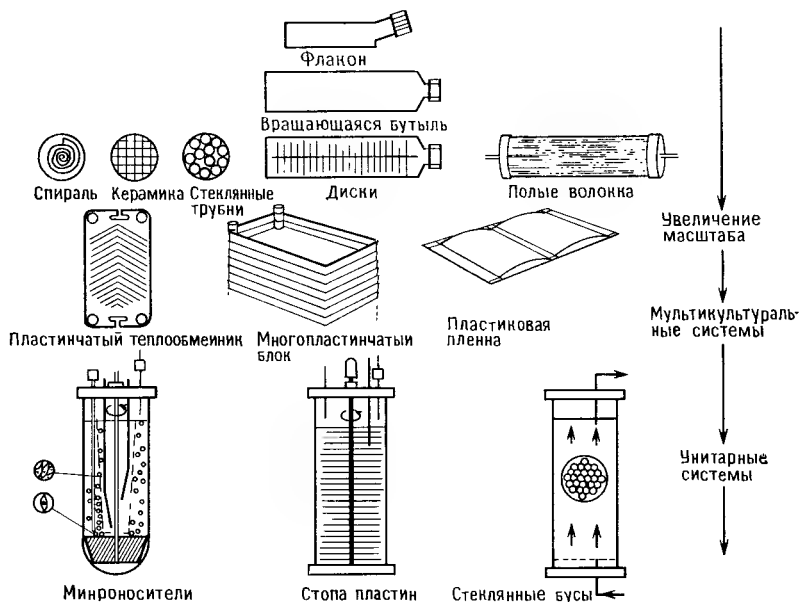


Рис. 3.6. Увеличение масштаба культуральных систем для клеток, зависящих от субстрата.

получение единичных систем гомогенных клеток с огромными возможностями увеличения масштаба. Однако такие системы можно пытаться применять только в том случае, если имеется достаточно времени и средств для обеспечения длительного периода развития культуры.

Итак, суспензионные культуры представляются предпочтительными с точки зрения увеличения выхода клеток. Монослойные культуры, однако, также обладают рядом преимуществ.

- а) Очень легко провести полную замену среды и промыть пласт клеток перед добавлением свежей среды. Это особенно важно в тех случаях, когда рост клеток проводится в одних экспериментальных условиях, а наработка продукта — в других условиях, в частности при переносе клеток из среды с сывороткой в бессывороточные условия.

Эффективность смены среды в монослойных культурах такова, что позволяет достигать полного удаления нежелательных компонентов.

- б) Если нужны искусственно высокие плотности клеток, то это может быть достигнуто с помощью использования перфузионной техники. Монослойные культуры сильно облегчают применение перфузионных систем, поскольку в этом случае отпадает необходимость использования тонких систем фильтрации для удержания клеток.
- в) У многих клеток экспрессия требуемого продукта происходит значительно эффективнее, если клетки прикреплены к субстрату.
- г) Одна и та же аппаратура может быть использована с разными соотношением среда/клетки, которое, естественно, может легко изменяться в ходе эксперимента.
- д) Монослойные культуры обеспечивают наибольшую гибкость исследований, поскольку они могут быть использованы для любого типа клеток. Если нужно использовать несколько типов клеток, то, не задумываясь, следует выбирать монослойную культуру.

Следует отметить, что система с микроносителями обладает преимуществами г), д) и отчасти б) по сравнению с суспензионной культурой. У монослойной культуры по сравнению с суспензионной можно отметить четыре главных недостатка.

- а) Трудоемка и дорога при увеличении масштаба.
- б) Требуется значительно больше пространства.
- в) Невозможно с достаточной эффективностью проследить рост клеток, поскольку трудно отбирать пробы и подсчитывать клетки.
- г) Более сложно определять и контролировать такие параметры, как pH и O_2 , и обеспечивать однородность клеток.

Во всех случаях использование микроносителей исправляет эти недостатки монослойной культуры.

3.2. Прикрепление клеток

Поверхности клеток животных и поверхности традиционных культуральных сосудов из стекла и пластика несут отрицательные заряды. Поэтому для прикрепления клеток необходимо образование поперечных сшивок с гликопротеинами, а также присутствие двухвалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} . Наиболее изученным из таких гликопротеинов является фибронектин. Он имеет молекулярную массу 220 000 дальтон, синтезируется многими клетками и присутствует в сыворотке и других физиологических жидкостях. И хотя клетки могут, по-видимому, прикрепляться за счет одних только электростатических взаимодействий, было показано, что механизм прикрепления оказывается

одним и тем же при всех зарядах субстрата [7]. Важным фактором является суммарный отрицательный заряд, и субстраты, обладающие высокой поверхностной энергией (стекло и пластик), оказываются весьма удобными для прикрепления клеток. Органические поверхности должны быть смачиваемыми и отрицательно заряженными; это может достигаться как химической обработкой (например, окисляющими агентами, сильными кислотами), так и в результате физических воздействий (высоковольтный разряд, облучение ультрафиолетовым светом, бомбардировка электронами высоких энергий). Эти методы используются фирмами, поставляющими пластиковую посуду для культур. В результате таких обработок увеличивается общий отрицательный заряд поверхности (например, за счет образования отрицательно заряженных карбоксильных групп), что облегчает электростатическое прикрепление клеток. Поверхность культурального сосуда может быть также покрыта веществом, облегчающим прикрепление клеток. Наиболее часто используемыми для этого агентами являются коллаген и полиаминокислоты. Можно использовать продажные препараты коллагена для культуры ткани (Витроген 100, Flow Laboratories), что позволит избежать утомительной процедуры получения коллагена из крысиных хвостов. Успешное применение коллагена в качестве ростовой поверхности было продемонстрировано также при выращивании клеток на покрытых коллагеном микроносителях (Цитодек-3, Pharmacia Fine Chemicals).

3.2.1. Поверхности для прикрепления клеток

- а) *Стекло*. Предпочтительнее использовать алюмо-боросиликатное стекло (например, пирекс), поскольку Na-силикатное стекло может подщелачивать среду и перед употреблением должно быть детоксифицировано путем кипячения в слабой кислоте. При повторном использовании стеклянная посуда становится менее пригодной для прикрепления клеток, но эффективность прикрепления может быть восстановлена с помощью обработки 1 мМ ацетатом магния. После нескольких часов вымачивания при комнатной температуре раствор ацетата удаляется, посуда ополаскивается дистиллированной водой и автоклавируется.
- б) *Пластик*. Наиболее часто используемым пластиковым материалом для культуры клеток является полистирол, но можно также использовать полиэтилен, поликарбонат, поливинилхлорид, тефлон, целлофан и ацетат целлюлозы при условии правильной обработки этих полимеров.
- в) *Металлы*. Для роста клеток пригодны как нержавеющая сталь, так и титан, поскольку оба вещества химически относительно инертны и обладают достаточно высоким отрицательным поверхностным зарядом. Существует много марок нержавеющей

щей стали и следует выбирать такие сорта, которые не высвобождают токсические ионы металлов. Наиболее часто используется для культур марка стали 316, но пригодны также марки 321 и 304. Нержавеющая сталь должна быть промыта кислотой (смесь 10% азотной кислоты, 3,5% фтористоводородной кислоты и 86,5% воды) для удаления поверхностных загрязнений и включений, образующихся при обрезании листа.

3.3. Наращивание клеток; этап 1, вращающиеся бутылки

Для получения оптимального количества клеток в культуре необходимо обеспечить клетки максимальной поверхностью для роста, сохраняя при этом минимум объема среды и воздушной фазы. Стационарные культуры обладают только одной поверхностью, к которой могут прикрепляться клетки; следовательно, они требуют большого объема среды. Количество среды может быть снижено при помещении культуры на качалку или же чаще при использовании вращающихся цилиндрических сосудов. У вращающихся бутылей почти вся внутренняя поверхность доступна для роста клеток, хотя в каждый момент времени лишь 15—20% поверхности бутылки покрыто средой. При вращении бутылки клетки попеременно оказываются на воздухе или под средой, тогда как в стационарной культуре наблюдаются почти анаэробные условия. Этот метод культивирования позволяет снижать объем среды, но все еще требует значительной воздушной фазы для поддержания достаточного количества кислорода и нужного рН. Увеличение масштаба культуры при использовании вращающихся бутылей требует использования сосудов с минимально возможным диаметром. Поверхность роста может быть увеличена вдвое как за счет удвоения диаметра, так и за счет удвоения длины. Однако в первом случае объем среды и воздушной фазы увеличивается в 4 раза, а во втором случае — только в 2 раза.

Единственным способом увеличения продуктивности вращающихся бутылей и снижения их объема является использование перфузионной системы, впервые разработанной Крузе [8] и поставляемой New Brunswick Scientific Company и Bellco Glass Inc. (автосборщик). Это дорогостоящее оборудование, поскольку в нем использовано сложное вращающееся соединение для обеспечения подключения бутылки к перфузионной системе. Однако при использовании такой системы значительно увеличивается выход клеток и достигается экстенсивный многослойный рост.

3.3.1. Методика использования стандартных вращающихся одноразовых культур

Приведенная ниже процедура основана на использовании пластиковых бутылей разового использования с рабочей поверхностью 1400 см^2 ($23 \times 12 \text{ см}$), поставляемых фирмами Corning или Becton Dickinson.

- I. Добавьте 300 мл ростовой среды.
- II. Добавьте $1,5 \times 10^6$ клеток.
- III. Вращайте бутылку со скоростью 12 об/ч при 37°C в течение 2 ч для обеспечения равномерного распределения клеток на фазе прикрепления.
- IV. Снижайте скорость вращения до 5 об/ч и продолжайте инкубацию.
- V. Исследуйте клетки в инвертированном микроскопе, используя длиннофокусный объектив.
- VI. При достижении видимого монослоя (5—6 сут) удалите среду, добавьте трипсин (0,25%) и после дополнительного вращения соберите клетки. Выход клеток будет очень близок к таковому во флаконах при условии добавления достаточного количества среды. Преимуществом предложенного метода является возможность легкого изменения отношения объема среды к площади поверхности роста клеток. Поэтому после окончания фазы роста объем среды может быть снижен, что приведет к более высокой концентрации накапливающегося продукта.

3.4. Наращивание клеток; этап 2, модификация вращающихся бутылей

Система вращающихся бутылей относится все еще к мультикультуральным системам и поэтому требует большого количества обслуживающего персонала и материалов. Для увеличения поверхности для роста клеток внутри вращающихся бутылей разработаны следующие приспособления (рис. 3.6).

3.4.1. Пленки

Большой культуральный сосуд фирмы Sterlin, размерами $25 \times 10 \text{ см}$ снабжается патроном, содержащим свернутую по спирали пластиковую пленку с общей поверхностью 8500 см^2 . Строго говоря, эта система не относится к вращающимся бутылкам, поскольку вращение со скоростью 2—3 об/ч осуществляется только на фазе прикрепления клеток (3—16 ч). После прикрепления клеток сосуд устанавливается вертикально, и, поскольку весь он заполнен средой (1,8 л), аэрация осуществляется путем пробулькивания. Эта система успешно используется для линий гетероплоидных клеток, таких как ВНК и 3Т3,

и обеспечивает выход $1-2 \cdot 10^9$ клеток при посеве $1 \cdot 10^8$ клеток. Для диплоидных клеток система оказывается не столь удобной. Главным моментом при использовании этой системы является равномерность распределения клеток по поверхности спирали; в противном случае рост клеток будет неравномерным и выход снизится. Рост клеток можно наблюдать только на внешней поверхности спирали, и при неравномерном распределении клеток обследование внешней поверхности может приводить к неправильной оценке числа клеток.

3.4.2. Стеклянные трубки

Примером небольшой культуры может служить культуральная система Bellco-Corbeil (Bellco Glass Inc.), первоначально разработанная Корбейлом [9]. Во вращающуюся бутылку помещается пучок параллельных мелких стеклянных трубок, разделенных силиконовыми прокладочными кольцами. Фирма предоставляет три варианта системы с рабочей поверхностью $5 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$ и $1,5 \cdot 10^4$ см². Сосуд перфузируется средой из внешнего резервуара. Оригинальность системы заключается в чередовании вращения на 360° по часовой стрелке и против часовой стрелки. Это позволяет отказаться от использования специальных крышек для подведения перфузионной среды.

Примером использования такой системы является получение $3,2 \cdot 10^9$ клеток Vero ($2,3 \cdot 10^5$ /см²) в течение 6 сут с использованием 6,5 л среды (скорость перфузии 50 мл/мин) и варианта сосуда с поверхностью роста 10 000 см².

Аналогично устроена система Gyrogen (Chemar A. G). Фирма предоставляет системы шести размеров с рабочей поверхностью от 0,52 до 34 см². Мелкие блоки заключены в стеклянные сосуды, а более крупные вмонтированы в цилиндры из нержавеющей стали, обеспечивающие вращение, контроль условий культивирования, микроскопическое обследование и стерилизацию *in situ*.

3.4.3. Пластины

В настоящее время эти системы редко используются, но здесь приводится их описание, поскольку лежащие в их основе принципы находят применение в крупных установках и они могут быть легко созданы в лабораторных условиях. Фирма Linbro предоставляет патроны из 40 дисков, расположенных параллельно на центральном стержне. Это обеспечивает рабочую поверхность 6300 см² во вращающемся сосуде размерами 12×22 см. Сосуд наполовину заполняется средой и используется как обычная вращающаяся бутылка.

Значительно более крупный вариант с использованием тановых дисков, обеспечивающий общую рабочую поверхность $1,7 \text{ м}^2$, поставляется фирмой Biotec Inc. Эта система в настоящее время почти не используется, так как пластиы клеток, достигшие полного монослоя, часто отделяются от диска. Однако принципы этой системы были перенесены в ферментёр со стопой пластин (разд. 3.6.2). Главным недостатком систем с вертикальными пластинами является сложность достижения равномерного прикрепления клеток при заполнении сосуда наполовину.

3.5. Наращивание клеток; этап 3, стационарные культуры большой емкости

3.5.1. Многопластинчатый блок (A/S NUNC)

Стандартный многопластинчатый блок состоит из 10 камер с рабочей поверхностью 600 см^2 каждая. Камеры скреплены друг с другом и снабжены соединяющими их каналами. Это позволяет проводить каждую операцию для всех камер одновременно. Следовательно такой блок можно рассматривать как сосуд с рабочей поверхностью 600 см^2 , использующий 2 л среды и занимающий объем $12\,500 \text{ см}^3$. Этот блок удобен для практического использования и позволяет получать такие же хорошие результаты, как и при выращивании в пластиковых флаконах. Блок сделан из полистирола и предназначен для одноразового использования. Один из недостатков этой системы может обернуться ее преимуществом. На практике бывает трудно удалить все клетки после их открепления от подложки трипсином или другими агентами. Однако остающиеся в блоке клетки можно использовать в качестве инокулята для новой культуры при добавлении свежей среды. С помощью надежной асептической техники сбора клеток этот блок одноразового пользования может быть повторно задействован 3—4 раза. Система нескольких соединенных между собой блоков используется в промышленности для производства интерферона [10]. Кроме того, поставляются также блоки с рабочей поверхностью $1200 \pm 24\,000 \text{ см}^2$.

3.5.2. Культуры на полых волокнах

Пучки синтетических полых волокон являются таким же матриксом, как и сосудистая система, и позволяют клеткам достигать плотности, сходной с таковой в ткани. Полые волокна обычно используются в ультрафильтрации благодаря способности к селективному проникновению макромолекул через пористую стенку волокон при постоянном протекании жидкости через

просвет волокна. Если пучок таких волокон поместить в патрон и закрыть с обеих сторон, то при пропускании через патрон культуральной среды она будет проникать через стенки волокон, обеспечивая большую поверхность для прикрепления и роста клеток.

Культуральные камеры, построенные по этому принципу (витафibr), поставляются фирмой Amicon Corporation. Капиллярные волокна изготавливаются из акрилового полимера, имеют диаметр 350 мкм и толщину стенки 75 мкм. Поры в стенках волокон ограничивают проникновение макромолекул с мол. массой между 10 000 и 100 000 дальтон. Определить общую поверхность такого блока, доступную для роста клеток, трудно. Однако фирма поставляет блоки разного размера, и они характеризуются очень высоким отношением рабочей поверхности к объему культуральной среды (около $30 \text{ см}^2/\text{см}^3$). В этой системе можно вырастить до 10^8 клеток/мл.

3.5.3. Культуральная система Оптицелл

Недавно фирмой K. C. Biological предложена новая культуральная система, в которой для роста клеток используется керамический материал. Она состоит из цилиндрического керамического патрона (поставляются варианты с рабочей поверхностью от 4,25 до 18 м^2) с каналами площадью 1 мм^2 по всей длине цилиндра. Систему дополняет перфузионный контур во внешний резервуар, где осуществляется контроль качества среды. Система обеспечивает высокое отношение рабочей поверхности к объему (40:1), и результаты предварительных исследований показали пригодность этой системы для производства вирусов и поверхностных антигенов клеток.

3.5.4. Пластиковые мешки [11]

Мешки, изготовленные из фтор-этилен-пропиленового сополимера (ФЭП-Тefлон; Du Pont), биологически инертны, но характеризуются очень высокой проницаемостью для газов. Мешки размером 5×10 см, заполненные клетками и средой (толщина слоя 2—10 мм), могут быть помещены в термостат. Система обеспечивает достаточное снабжение культуры кислородом (клетки растут внутри мешка и отделены от воздуха мембраной толщиной 25 мкм), что позволяет получить высокую плотность клеток. Культуру можно помещать на качалку или вращать для поддержания гомогенности среды. Клетки можно снимать обычной трипсинизацией либо механически, путем выворачивания мешка и соскребания клеток.

3.5.5. Культиватор с пластиковой пленкой IL-410 [12]

Этот метод использует тот же самый материал (ФЭП-Тefлон), но не в виде мешков, а в виде длинных трубок, накрученных с прокладками на катушку. Среда прокачивается через трубки и может либо удаляться, либо рециркулировать через внешний резервуар. Газообмен между средой и воздушным пространством термостата осуществляется через стенки трубок. Длина используемых трубок может достигать 10 м, а их рабочая поверхность, пригодная для роста клеток, составляет 25 000 см².

3.5.6. Пластинчатый теплообменник

Пластинчатый теплообменник обладает большой рабочей поверхностью из нержавеющей стали; при этом обеспечивается достаточная циркуляция среды на одной стороне листов и тепловой воды (37 °C) на другой стороне поверхности роста клеток. Система поставляется фирмой AVP в виде блоков с рабочей поверхностью 2 м² [13].

3.6. Наращивание клеток; этап 4, системы ферментёров

Существуют три основные системы, которые можно отнести к ферментационным (суспензионные культуры) аппаратам (см. рис. 3.6).

- а) Клетки неподвижны, среда перемещается (например, реактор со стеклянными бусами).
- б) Гетерогенное перемешивание (например, реактор состойной пластин).
- в) Гомогенное перемешивание (например, микроносители).

Таблица 3.2. Свойства стеклянных бус с диаметром 3 мм

Вес (г)	0,0375
Площадь поверхности (см ²)	0,283
Объем (см ³)	0,015
Упаковочный объем (см ³)	0,028
Таким образом, культура с рабочей поверхностью 10 000 см ² имеет следующие параметры:	
Количество стеклянных бус	35 336
Общий объем	990 мл
Объем среды	460 мл
Относительная площадь поверхности	21 см ² /мл
Типичный размер культурального сосуда	20×8 см

3.6.1. Реактор со стеклянными бусами

Использование для выращивания клеток подложки из стеклянных бус диаметром 3—5 мм, сквозь которую непрерывно протекает среда, неоднократно упоминалось многими исследователями начиная с 1962 г. Принципиальная возможность такой системы для увеличения масштабов культивирования клеток была показана Вайтсидом и Спиром [14], которые использовали систему с емкостью 100 л для выращивания клеток ВНК21 и FMDV.

Бусы диаметром 3 мм располагают достаточно плотно, чтобы предотвратить смещение упакованных бус; при этом существенно обеспечить протекание среды через колонку с такой

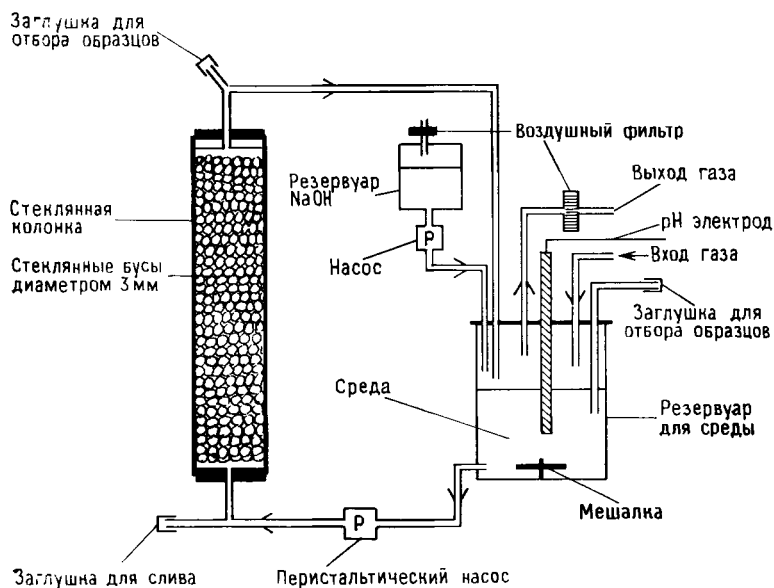


Рис. 3.7. Система культивирования на стеклянных бусах.

скоростью, которая не вызывает механического повреждения клеток. Физические свойства стеклянных бус приведены в табл. 3.2, и эти данные позволяют рассчитать необходимые параметры системы культивирования. Система может быть создана в лабораторных условиях (см. рис. 3.7). На этом рисунке среда перемещается с помощью перистальтического насоса, но может быть также использован воздушный лифт, что обеспечивает лучшую оксигенацию. Среда может поступать либо сверху, либо снизу колонки, что не влияет на результаты культивирования.

Схема эксперимента

- I. Приготовьте достаточно среды для перфузии.
- II. Включите циркуляцию среды между резервуаром и культуральным сосудом до уравнивания системы по температуре и pH (выждать достаточное время для прогрева стеклянных бус до 37 °C).
- III. Добавьте порцию клеток ($\sim 1 \times 10^4 / \text{см}^2$) к объему среды, равному свободному объему колонки.
- IV. Выпустите среду из колонки с бусами в резервуар, тщательно перемешайте клеточную суспензию и введите в колонку с бусами.
- V. Перекройте все соединения и дайте возможность клеткам прикрепиться (3—8 ч в зависимости от типа клеток).
- VI. После прикрепления клеток начните перфузию колонки средой, сначала с низкой скоростью (1 см в 10 мин). Визуально контролируйте помутнение оттекающей среды, свидетельствующее об отсутствии прикрепления клеток (в этом случае прекратить перфузию).
- VII. После 24 ч скорость перфузии может быть увеличена, но не выше, чем до 5 см/мин; в противном случае может происходить смыв клеток (особенно находящихся в митозе). Контролируйте pH на входном участке и сравнивайте концентрации глюкозы во входной и выходной заглушках для отбора образцов. Результаты этих измерений покажут достаточность скорости тока среды.
- VIII. Контролируйте рост клеток по результатам определения концентрации глюкозы. Скорость утилизации глюкозы следует определять эмпирически для каждого типа клеток и используемой среды, но приблизительная оценка дает результат $2\text{—}5 \cdot 10^8$ образующихся клеток на 1 г глюкозы.
- IX. Когда культура по вашим оценкам достигнет полного монослоя, отключите перфузионную систему, удалите из колонки среду, промойте колонку буфером и добавьте смесь трипсин — версен (или проназы и т. п.) в количестве, равном свободному объему колонки; оставьте на 15—30 мин. Сбор клеток может быть ускорен сливом трипсина и обратным добавлением в колонку. Другим способом ускорения сбора клеток может служить пробулькивание газа через колонку (с очень низкой скоростью во избежание смещения бус и повреждения клеток).
- X. Культуральный сосуд должен быть вымыт немедленно после использования. В противном случае его будет очень трудно очистить. Для этого необходимо обеспечить непрерывную циркуляцию через систему раствора детергента (типа Декон), затем водопроводной воды и нескольких смен дистиллированной воды. Стерилизуйте сосуд паром,

Таблица 3.3. Сравнение

	Цитодекс 1	Цитодекс 2	Цитодекс 3	Супербус
Производитель	Pharmacia	Pharmacia	Pharmacia	Flow Labs
Материал	ДЭАЭ-сефадекс	ДЭАЭ-сефадекс	Коллаген (60 мг/см ²)	ДЭАЭ-сефадекс
Удельный вес	1,03	1,04	1,04	1,03
Форма	Сферич.	Сферич.	Сферич.	Сферич.
Размер (диаметр в мкм)	160—230	115—200	130—210	150—200
Площадь поверхности, см ² /г	6000	5500	4600	6000
Стоимость/м ² (в произвольных единицах)	2,5	2,8	4,0	4,0
Поставка	Сухой нестерильный	Сухой нестерильный	Сухой нестерильный	Раствор стерильный

если вам необходимо отобрать контрольные пробы (O₂, pH). Используйте бусы из пирекса вместо обычных лабораторных бус, изготавливаемых из Na-силикатного стекла.

3.6.2. Гетерогенный реактор

Этот метод культивирования основан на том же принципе, что и дисковая вращающаяся культура, описанная ранее (разд. 3.4.2). Круглые пластины из стекла или нержавеющей стали устанавливаются вертикально на центральном стержне на расстоянии 5—7 мм друг от друга. Этот стержень может быть неподвижным, тогда для перемешивания используется воздушный лифт. Другой вариант состоит во вращении стержня вокруг вертикальной (6 об/ч) либо горизонтальной (50—100 об/мин) оси. Известны сообщения об использовании мультиповерхностных реакторов [15] объемом от 7,5 до 200 л, обеспечивающих рабочую поверхность до 2×10^5 см². Опыт автора ограничен работой только с системами с горизонтально расположенными дисками (рис. 3.6, стопа пластин), которые просты в обращении и успешно используются для гетероплоидных и диплоидных клеток человека. Главным недостатком этого типа культур является высокое отношение объема среды к рабочей поверхности (1 мл на 1—2 см²). Не удается добиться существенного улучшения этого параметра при переходе к системам с горизонтальными дисками, хотя в последнем случае отношение оказывается вдвое ниже, чем в системе с вертикально вращающимися дисками.

микроносителей

Бионосители	Биосилоны	Цитосферы	Гелибусы	Целлюлоза	Акробусы
Bio Rad	Nunc	Lux	КС Bio- logical	Whatman	Galil
Полиак- риламид 1,04	Полисти- рол 1,05	Полисти- рол 1,05	Желатин	ДЭАЭ-цел- люлоза ?	Различ- ный
Сферич. 120—180	Сферич. 160—300	Сферич. 160—230	Сферич. 115—235	Цилиндрич. Варьирует	Сферич. 150—150
5000	255	250	3800	2—4000	5000
4,0	11	45	3,5	1,5	—
Сухой не- стерильный	Сухой стерильный	Сухой стерильный	Сухой не- стерильный	Влажный не- стерильный	Сухой не- стерильный

3.6.3. Гомогенные системы [микроносители]

Когда клетки растут на мелких сферических носителях, они могут рассматриваться как клеточные суспензии и для их выращивания могут применяться процессы и аппаратура, разработанные для суспензионных культур. Культивирование клеток на микроносителях было впервые предложено Ван Везелем [16], использовавшим гранулы декстрана (сефадекс А-50). Полученные результаты не были полностью удовлетворительными из-за неподходящего заряда гранул, а также, по-видимому, вследствие токсических эффектов. Однако проведенная с тех пор большая исследовательская работа привела к тому, что в настоящее время в широкой продаже имеются многие типы подходящих микроносителей (табл. 3.3).

Практические исследования авторов были связаны преимущественно с микроносителями цитодекс (Pharmacia), так что большая часть обсуждения будет связана именно с этими продуктами. Выбор микроносителей этого типа был обусловлен а) предпочтением к сухому продукту, который мог быть аккуратно взвешен и затем подготовлен *in situ*, и б) низкой плотностью этого продукта ($1,03 \text{ г/см}^3$), позволяющей использовать его в концентрации до 15 г/л ($90\,000 \text{ см}^2/\text{л}$). Однако наше расположение к цитодексам не снижает ценности других микроносителей, многие из которых могут быть использованы с равным успехом.

1. Аппаратура для культивирования. Стандартные сосуды с перемешивающим цилиндром непригодны для этого типа культур без модификации системы перемешивания. Необходимы мешал-

ки с большой площадью поверхности лопастей. Такие системы поставляются фирмой Bellco (Беллко μ -сосуд с мешалкой; см. рис. 3.12), но могут быть легко изготовлены самостоятельно из листа силиконовой резины, присоединенной к покрытому пластиком магниту. Преимущество создания мешалки в лабораторных условиях заключается в возможности отклонения лопастей от вертикали на $20-30^\circ$, что обеспечивает значительно лучший

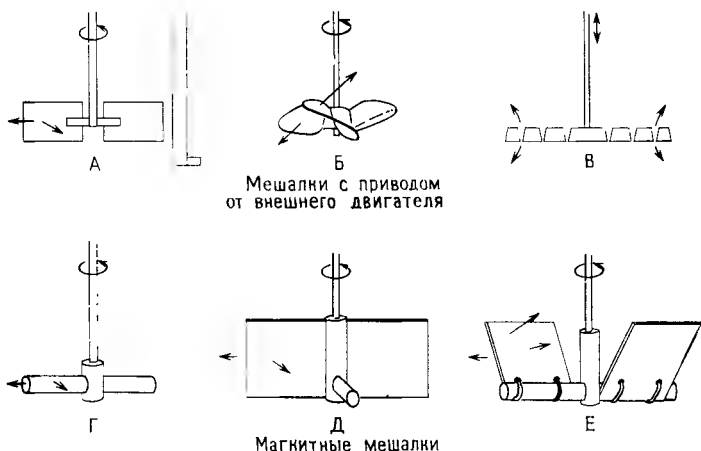


Рис. 3.8. Типы мешалок для выращивания клеток в суспензии или на микроносителях. (А) турбина с плоскими лопастями, $d_2 : d_1 = 0,33$, радиальное турбулентное перемешивание; (Б) морской винт, $d_2 : d_1 = 0,33$, аксиальное турбулентное перемешивание, угол 25° ; (В) вибро-миксер; (Г) перемешивающая палочка, $d_2 : d_1 = 0,6$, радиальное ламинарное перемешивание; (Д) вертикальная и (Е) угловая (25°) лопасти, $d_2 : d_1 = 0,6-0,9$; аксиальный и радиальный ток жидкости, ламинарное и турбулентное перемешивание; d_2 — диаметр мешалки, d_1 — диаметр сосуда.

подъем микроносителей и перемешивание по сравнению с вертикально расположенными лопастями (рис. 3.8). Культура с микроносителями перемешивается очень медленно ($V \leq \leq 75$ об/мин), поэтому необходимо использовать магнитные мешалки высокого качества, обеспечивающие плавное перемешивание в диапазоне скоростей $20-100$ об/мин. Нельзя использовать перемешивающие механизмы, в которых движущиеся поверхности соприкасаются друг с другом в среде: это может привести к разрушению микроносителей. Поэтому для культур с микроносителями непригодны сосуды с помещенным на дно вращающимся магнитом. Поскольку перемешивание, а следовательно, и перемещение массы в таких культурах очень слабое, глубина среды не должна превышать диаметр сосуда более чем в два раза, если только не предусмотрена система оксигениро-

вания или регулярная смена среды. В основных культуральных системах смена среды должна производиться достаточно часто. Это заставляет предусмотреть соответствующие подсоединения к культуральному сосуду, обеспечивающие удобную смену среды *in situ*. Одновременно при этом снижается риск занесения в культуру микроорганизмов. Упрощенная установка для культивирования на микроносителях представлена на рис. 3.9.

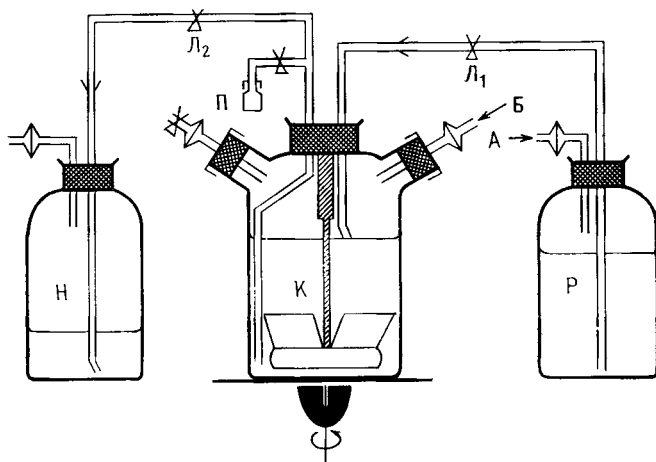


Рис. 3.9. Простые системы культур на микроносителях, обеспечивающие легкую смену среды. Для заполнения культурального сосуда К открыть вентиль Л1 и перекачать среду из резервуара Р, нагнетая воздух через трубку А. Для отбора клеток остановить на 5 мин мешалку, открыть вентиль Л2 и перекачать среду из К в Н, нагнетая воздух через трубку Б. П — устройство для отбора проб.

II. Посев культуры. При посеве культуры с микроносителями критичными оказываются многие факторы, перечисленные в разд. 2. Микроносители имеют сферическую форму, а клетки всегда прикрепляются к участкам с минимальной кривизной. Хотя поверхность микроносителей не может быть идеальной, но она обязана быть приемлемой по своим химическим и физическим свойствам. Убедившись в том, что среда и гранулы находятся при оптимальных рН и температуре, вносите в культуру клетки (с логарифмической, но не со стационарной фазы культуры) в объеме среды, составляющем треть конечного объема. Это увеличивает вероятность контакта клетки с микроносителем. Конечная концентрация микроносителей должна составлять 2—3 г/л, а более высокие концентрации требуют повышенного контроля условий культивирования и очень частых смен среды. Раньше предпочитали проводить связывание

клеток с микроносителями в стационарной культуре, перемешивая ее каждые 30 мин в течение 30 с. Это, однако, всегда приводило к неравномерному распределению клеток между гранулами микроносителя, и в настоящее время резкое улучшение качества микроносителей позволяет начинать перемешивание немедленно при минимально возможной скорости, обеспечивающей полное перемешивание (10—25 об/мин).

По завершении прикрепления (3—8 ч) объем культуры медленно доводят до рабочего, и скорость перемешивания увеличивается для поддержания полностью гомогенной смеси. При выполнении этих условий и при отсутствии изменений температуры и рН возможна инициация роста культуры на микроносителях для всех клеток, способных расти на пластиковой поверхности.

III. Поддержание культуры. Анализ роста клеток в культуре на микроносителях не представляет никакой проблемы. Легко производится отбор проб, определяется число клеток (по подсчету ядер), концентрация глюкозы и исследуется морфология клеток. По мере роста клеток гранулы микроносителя становятся тяжелее, что требует увеличения скорости вращения. После 3 дней культивирования или около того происходит закисление культуры и следует сменить среду. Это также оказывается чрезвычайно простой процедурой: мешалка отключается, гранулам с клетками дают осесть в течение 5 мин и затем удаляется столько среды, сколько нужно. После этого культура осторожно заполняется свежей средой, нагретой до 37 °C, и перемешивание возобновляется.

IV. Сбор клеток. Для многих типов клеток сбор их с микроносителей оказывается весьма трудной задачей, если клетки не достигнут высокой плотности на гранулах. К сожалению, нет оснований ожидать многослойного роста клеток на микроносителях; это случается крайне редко. Сбор клеток начинается с удаления среды, по крайней мере одноразовой промывки гранул с клетками буфером и суспендирования микроносителей с клетками в растворе соответствующего фермента. Культура затем перемешивается при высокой скорости (75—125 об/мин) в течение 20—30 мин. Если клетки открепятся, то значительная их часть может быть собрана, если дать гранулам осесть в течение 2 мин и затем декантировать супернатант. Для более полного отбора смесь переносится в стеклянный фильтр с крупными порами. Клетки будут проходить через фильтр, а гранулы микроносителя задержатся на нем.

Применение новых образцов микроносителей сильно упростило сбор клеток. Получены покрытые коллагеном гранулы Цитодекса-3, с которых клетки снимаются коллагеназой. Желатиновые гранулы фирмы Cgping могут солиubilizироваться трипсином и/или этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА).

V. Увеличение масштаба культур на микроносителях. Увеличение масштаба может быть достигнуто а) увеличением концентрации микроносителей и б) увеличением размера культур. Если идти по пути а), то возникают быстрые истощение питательных веществ и кислорода в среде и снижение рН до нефизиологических значений. Смены среды не только утомительны, но и

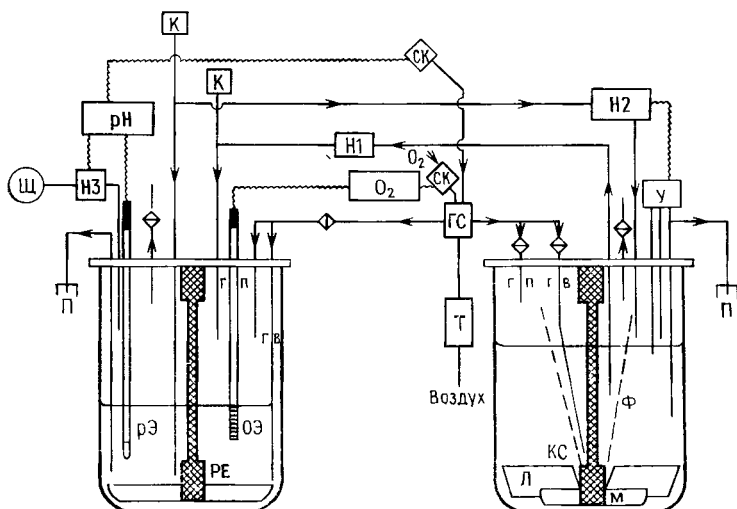


Рис. 3.10. Система перфузии по замкнутому контуру с полным контролем параметров среды для выращивания клеток при высокой концентрации микроносителей. КС — культуральный сосуд; РЕ — резервуар; К — коннектор для смены среды, сбора и т. д.; Ф — фильтр; ГС — газовый смеситель; У — контроллер уровня; П — устройство для отбора проб; М — магнит; Щ — резервуар со щелочью (NaOH); ОЭ — кислородный электрод; рЭ — pH электрод; Н — насосы; Н1 — среда к резервуару (постоянно); Н2 — среда в культуру (контролируется У); Н3 — щелочь к резервуару (контролируется pH-метром); Т — измеритель скорости тока воздуха; гп — поступление газа для поверхностной аэрации; гв — поступление газа для пробурливания; СК — соленоидный клапан; Л — лопасти.

приводят к нежелательным быстрым изменениям окружающих условий. Для получения культур с высокой концентрацией микроносителей следует применять либо проточную перфузию, либо перфузию по замкнутому контуру. А это может быть достигнуто только при использовании высокoeffективных систем фильтрации, чтобы среда без клеток и микроносителей удалялась с высокой скоростью. Единственный удовлетворительный способ достижения этого результата возможен при использовании системы фильтрации, изображенной на рис. 3.10. Система включает в себя сито из нержавеющей стали с диаметром пор 60—120 мкм. Крепление сита на валу мешалки обеспечивает

использование большой площади поверхности фильтра, и его вращение препятствует прикреплению клеток и забиванию пор [17].

Хотя этим способом и можно наращивать большое количество клеток, недостаточность кислорода остается главным фактором, который надо преодолевать. Это особенно сложная проблема в культурах с микроносителями, поскольку в этих

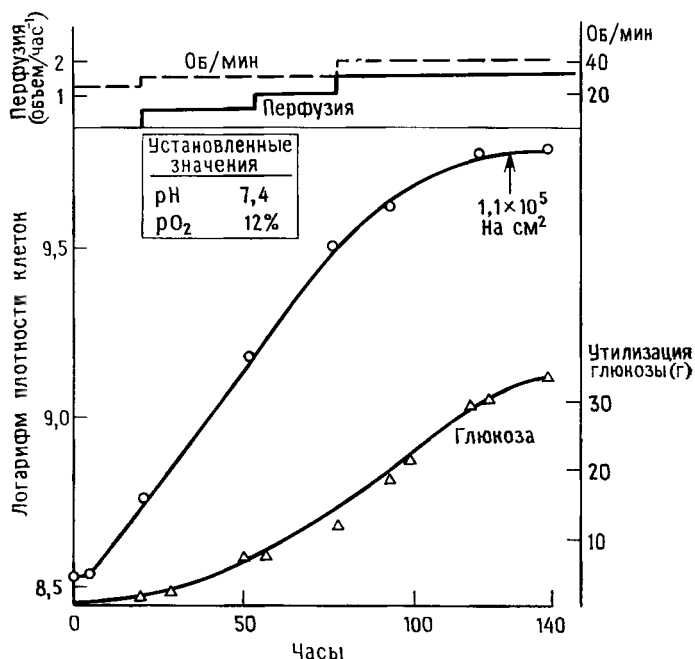


Рис. 3.11. Рост эпителиальных клеток GRK на Цитодексе-3 (10 г/л) в культуральной системе объемом 10 л, представленной на рис. 3.10.

условиях скорость перемешивания мала (в разд. 2.7 указывалось, что скорость вращения должна превышать 100 об/мин, чтобы это существенно сказывалось на скорости аэрации). Пробулькивание в культурах с микроносителями использовать невозможно, поскольку микроносители выносятся вверх с пузырьками воздуха и подсыхают. Описанный ранее перфузионный фильтр позволяет, однако, проводить пробулькивание в той части культуры, где отсутствуют гранулы микроносителя. К сожалению, это сопровождается тем, что большая часть оксигенированной среды удаляется в результате перфузии. Но при скорости пробулькивания 10 см³ кислорода на 1 л происходит значительная диффузия оксигенированной среды в основную

культуру. Снабжение кислородом культур с микроносителями может осуществляться благодаря следующим системам:

- а) Поверхностная аэрация.
- б) Увеличение скорости перфузии полностью оксигенированной среды из резервуара.

Таблица 3.4. Сравнение объемов среды и общих объемов для разных систем монослойных культур

	Площадь поверхности (см ²)		
	Общая	На см ³ среды	На см ³ культуры
Флаконы Ру	175—200	2	0,2
Вращающиеся бутылки	750—1500	4	0,3
— Пленки	8500	5	5
— Стекланные трубки	5000—340 000	2	4 ²⁾
— Пластмассы	6300—17 000	6—10	3—5
Мультипластинчатый блок	6000—24 000	2,5	0,5
Полые волокна	1000—5000	(30)	(25) ²⁾
Оптицелл	42 500—180 000	40	35 ²⁾
Пластиковые мешки	300 ¹⁾	5	5
Пластиковые трубки	25 000	25	20
Реактор со стекланными бусами	2 · 10 ⁶ ¹⁾	20	19 ²⁾
Мультиповерхностный реактор	2,5 · 10 ⁵	1,1	1,0
Ферментер со стопой дисков	3,5 · 10 ⁵ ¹⁾	1,7	1,3
Пластинчатый теплообменник	2 · 10 ⁴ —1,5 · 10 ⁷	6,7	3 ²⁾
Микроносители 5 г/л	30 · 10 ⁶ ¹⁾	30	24 ²⁾
15 г/л	2 · 10 ⁶ ¹⁾	90	75 ²⁾

¹⁾ Максимум для известных культуральных систем, но не теоретически возможный.

²⁾ С учетом резервуара и контрольного оборудования.

в) Пробулькивание защищенного фильтром отсека.

Все три системы использовались автором в установке, изображенной на рис. 3.10 для получения культур с Цитодексом-3 в концентрации вплоть до 15 г/л в культуральных сосудах с рабочим объемом от 2 до 20 л. Результаты типичного эксперимента представлены на рис. 3.11.

VI. Общий анализ использования культур с микроносителями. Культуры с микроносителями используются в промышленности для получения вакцин и интерферона в ферментерах объемом до 1000 л. Для этих процессов используются гетероплоидные или первичные клетки. К сожалению, результаты, полученные

с диплоидными клетками человека, недостаточно хороши, что бы можно было рекомендовать такую процедуру для культивирования этих клеток. Успешное выращивание клеток человека достигается только на оборудовании лабораторного масштаба (менее 20 л), где процессу культивирования можно уделять гораздо больше внимания. Одной из проблем культур большого объема становится необходимость большого количества рассеиваемых клеток. Сбор клеток с больших блоков крупномасштабных культур не всегда проходит очень удачно, хотя использование коллагеновых и желатиновых микроносителей значительно упростило эту проблему. Стоимость микроносителей достигает 1200—1500 фунтов стерлингов за 1 кг. Иногда возможно промывание и повторное использование гранул микроносителей, но это, естественно, невозможно в случае желатиновых и обработанных коллагеназой гранул.

3.7. Заключение

Был рассмотрен широкий диапазон поставляемого фирмами и создаваемого в лабораторных условиях оборудования. Приведенные данные дают возможность сделать выбор, исходя из количества и типа клеток, желаемого продукта, а также предполагаемых масштабов финансирования и количества рабочей силы. При выборе оборудования советуем учитывать данные, приведенные на рис. 3.6 и в табл. 3.4.

4. Суспензионные культуры

Как уже говорилось, для наращивания клеточной массы удобнее использовать не монослойные, а суспензионные культуры. Некоторые клетки, особенно кроветворные, лучше растут в суспензионной культуре. Другие клетки могут быть адаптированы или отобраны на рост в суспензии. И наконец, небольшая часть клеток, например линии диплоидных клеток человека (W1-38, MRC-5), вообще не выживает в суспензии. Помимо всего прочего некоторые клеточные продукты могут экспрессироваться, только когда клетки существуют в монослое либо после образования межклеточных контактов (например, для распространения внутриклеточных вирусов по клеточной популяции), что также ограничивает возможность использования суспензионной культуры.

4.1. Адаптация к суспензионной культуре

Различные линии клеток отличаются по способности адаптироваться к росту в суспензии. Для тех линий, которые обла-

дают потенциальной возможностью к росту в суспензии, существуют два основных способа перевода растущих на субстрате клеток в линии клеток, культивируемых в суспензии.

4.1.1. Отбор

С помощью отбора Пауль и Струзерс получили линию клеток LS из клеток L-929, а из клеток HeLa — клетки HeLa-S3. Метод основан на существовании в популяции слабо прикрепляющихся вариантов клеток. Такие клетки при достижении культурой полного монослоя отделяют от пласта легким соскребанием или осторожным покачиванием культуральной среды; затем среду собирают, а суспендированные в ней клетки осаждают центрифугированием. Клетки собирают таким способом из многих культур, чтобы получить достаточно большой инокулят (по крайней мере $2 \cdot 10^5$ клеток/мл), для посева новой культуры. Процедуру следует повторить несколько раз в течение долгого периода, поскольку значительное число собираемых клеток не является потенциально способными к росту в суспензии, а отделяется от монослоя потому, что они находились в фазе митоза. Известно, что клетки во время митоза округляются и оказываются слабо прикрепленными к субстрату. После нескольких циклов сбора слабо прикрепившихся клеток удается выделить популяцию жизнеспособных клеток, растущих и делющихся в суспензии; такие клетки могут оседать на субстрат, но не прикрепляются и не распластываются на нем.

4.1.2. Адаптация

В основе этого метода лежат те же принципы, что и при получении суспензионной культуры отбором. Однако в случае адаптации отбор направлен на клетки, находящиеся в суспензии благодаря механическому перемешиванию. Поскольку из большинства клеточных линий получается слишком большое число клеток, независимых от субстрата, вряд ли можно объяснить их появление только селекцией предсуществующих вариантов. Метод, описанный ниже и успешно примененный автором для многих клеточных линий, основан на исследованиях Кэпsticka с сотрудниками [19], проведенных на клетках ВНК21.

- I. Приготовьте суспензию клеток, обрабатывая монослой трипсином (0,1%) и версеном (0,01%).
- II. Подготовьте не менее двух, а лучше три или более сосуда с мешалкой, содержащих культуральную среду (любая известная среда, из которой удалены Ca^{2+} и Mg^{2+}).
- III. Добавьте клетки до концентрации не менее $5 \cdot 10^5$ клеток/мл и инкубируйте при перемешивании (минимальная воз-

можная скорость, поддерживающая суспензию в гомогенном состоянии, например 250 об/мин).

- IV. Отбирайте пробы и подсчитывайте число жизнеспособных клеток каждые 24 ч.
- V. Каждые 3 дня осаждайте клетки центрифугированием (800 об/мин) и суспендируйте в свежей среде до плотности не менее $2,5 \cdot 10^5$ клеток/мл. В зависимости от степени гибели клеток у вас почти наверняка будет возникать необходимость объединения нескольких культур для поддержания плотности клеток на требуемом уровне.
- VI. Если при смене среды обнаруживается значительное прикрепление клеток к поверхности культурального сосуда, особенно на границе среды и воздуха, добавьте в сосуд после удаления среды смесь трипсина (0,01%) и версена (0,01%) и инкубируйте при перемешивании в течение 30 мин при 37 °C. Открепившиеся клетки соберите центрифугированием. Если в суспензии появляются агрегаты клеток, их также можно обработать смесью трипсина и версена. Такая обработка обычно необходима при первой и второй сменах среды, но в дальнейшем необходимость в ней, как правило, отпадает. Если агрегация клеток сохраняется, добавьте в ростовую среду трипсин (50 мкг/мл) или диспазу (Boehringer).
- VII. Успешная адаптация обнаруживается вначале по увеличению количества клеток после смены среды, а далее по постоянному росту клеточной массы в течение данного периода времени, свидетельствующему о постоянной скорости роста.
- VIII. Обычно оказывается необходимым культивировать вновь полученную линию клеток при постоянном перемешивании, поскольку в статической суспензионной культуре возможна реверсия к зависимости от субстрата. Иногда клетки прикрепляются к поверхности без последующего расплывания и продолжают расти и делиться, сохраняя почти сферическую морфологию.

4.2. Статические суспензионные культуры

Многие линии клеток могут расти в суспензии в культуральных системах, используемых для культивирования клеток в монослое (т. е. без встряхивания или перемешивания). К числу клеточных линий, способных к такой форме роста, относятся многие линии лимфобластов (например, MOLT, RAJI), гибридомы и некоторые некроветворные клетки, такие как клетки LS, описанные в предыдущем разделе. Однако в последнем случае всегда существует опасность реверсии к монослою (небольшая часть линии клеток LS всегда прикрепляется к стенкам сосуда

и теряется при каждом пересеве). Статические суспензионные культуры клеток непригодны для увеличения масштабов культивирования по причинам, уже названным при рассмотрении монослойных культур.

4.3. Небольшие суспензионные культуры

Для удобства изложения небольшие суспензионные культуры в этой главе будут определяться так же, как и в разд. 2.1. Это чисто условное определение, основанное на том, что увеличение объема культуры выше 2 л требует введения в систему дополнительных факторов. Культивирование клеточной суспензии в лабораторных условиях осуществляется обычно во вращательных сосудах, названных так потому, что они содержат в качестве перемешивающего элемента магнитный стержень, приводимый в движение внешней магнитной мешалкой. Детали некоторых широко доступных вращательных сосудов, а также названия фирм-поставщиков и размеры приведены на рис. 3.12. Важно иметь магнитную мешалку высокого качества, чтобы создавалось достаточно сильное магнитное поле, плавно поворачивающее магнит в желаемом диапазоне скоростей вращения (50—500 об/мин), безотказно работающую в течение долгого времени. Кроме того, магнитная мешалка не должна слишком нагреваться, поскольку культуральный сосуд устанавливается прямо на ее верхушку, и желательно включать в систему тахометр, обеспечивающий регистрацию истинной скорости вращения. Всегда проверяйте, может ли мешалка запускаться из всех возможных положений после перерыва в энергоснабжении.

4.4. Факторы, определяющие процесс наращивания клеток

Увеличение масштаба культивирования возможно лишь при удовлетворении всех химических и физических потребностей клеток. Химические факторы требуют постоянной проверки окружающей среды и контроля содержания клеток в определенных физиологических условиях. Эти факторы, к числу которых относятся кислород, pH, компоненты среды, а также процесс удаления продуктов отходов, описаны в разд. 2.

Физические параметры включают в себя конфигурацию биореактора и его энергообеспечение. Функция перемешивающего ротора состоит в преобразовании энергии (выражаемой в кВт/м³) в гидродинамическое перемещение в трех направлениях (осевом, тангенциальном и радиальном). Ротор должен обеспечивать циркуляцию во всем объеме жидкости и создавать турбулентность (он должен и качать, и смешивать) для решения следующих задач: создания гомогенной смеси, поддержания клеток в суспензии, оптимизации скорости переноса массы меж-

ду различными фазами системы (биологической, жидкой и газовой), облегчения теплопередачи.

Эффективное перемешивание становится все более сложной проблемой при увеличении объема культуры, и особые проблемы связаны с рассеиванием энергии, подводимой для поддержания гомогенности. Лимитирующим фактором является энер-

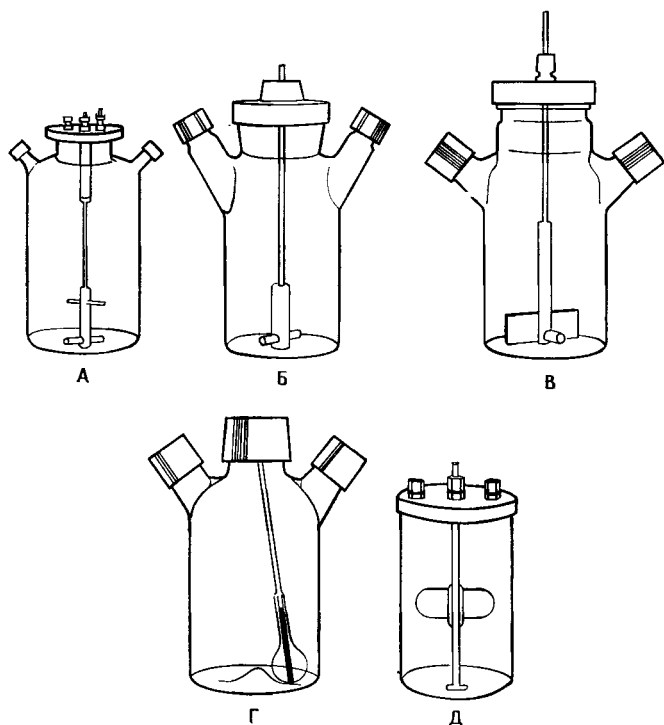


Рис. 3.12. Вращательные сосуды. (А) Сосуд Биокул фирмы LH Fermentation (1—20 л); (Б) Вращательные сосуды фирм Belco и Wheaton (25 мл — 2 л); (В) Вращательный μ -сосуд фирмы Belco (25 мл — 2 л); (Г) Сосуд фирмы Techne (0,25—5 л); (Д) Цитостат фирмы Techne (1 л).

гия, генерируемая на концах лопастей мешалки, поскольку эта энергия является источником повреждающих сил сдвига. Силы сдвига создаются изменяющимися скоростями тока жидкости в участках турбулентности. Факторами, которые влияют на этот процесс, являются: форма ротора (она определяет первичное направление индуцированного тока жидкости) (рис. 3.8), отношение диаметров ротора и сосуда, скорости вращения концов лопастей мешалки (функция скорости вращения и диаметра лопастей). Чем выше турбулентность, тем эффективнее оказывается перемешивание, но, чтобы не повреждать клетки, следует

добиваться компромисса. Большие роторы, вращающиеся с низкой скоростью, создают низкую силу сдвига и обладают высокой перекачивающей способностью, тогда как маленькие роторы требуют высоких скоростей вращения и создают высокую силу сдвига. Это явилось предпосылкой для создания мешалок спирального типа [20].

Магнитный стержень индуцирует только радиальные перемещения и не вызывает подъема жидкости и турбуленций. Ротор типа морского винта более эффективен в суспензионных культурах, чем ротор типа турбины с плоскими лопастями, применяемый во многих бактериальных системах, поскольку ротор типа винта обеспечивает лучшее перемешивание при низких скоростях вращения. Если клетки слишком хрупки или если достаточное перемешивание не может быть достигнуто при скоростях, не создающих еще повреждающих сил сдвига, следует прибегнуть к другим системам перемешивания с использованием пневматической энергии (перемешивание при пробулькивании воздуха, как, например, в ферментерах с воздушным лифтом) или гидравлической энергии (перфузия средой). Использование этих методов позволяет увеличивать масштаб культивирования без повышения подводимой мощности. Для увеличения эффективности механического перемешивания можно изменить конструкцию лопастей мешалки (как, например, в случае культур с микроносителями) или использовать несколько роторов. Некоторые примеры приведены на рис. 3.8.

Совершенно иная концепция перемешивания применена в Вибро-миксере. Здесь использован невращающийся вибратор, создающий перемешивание среды за счет реципрокных вертикальных перемещений с амплитудой 0,1—3 мм и с частотой 50 Гц. Перемешивающий диск монтируется на валу вибратора в горизонтальном положении, и конические отверстия в диске придают ему пакачивающее действие при вертикальном перемещении вала туда и обратно. Привод вала к двигателю осуществляется с помощью эластичной диафрагмы в верхней части культурального сосуда. Система ферментации, использующая этот принцип, поставляется фирмами Vibro-Fermenter, Chemar. Преимущества этой системы заключаются в заметно сниженных силах сдвига, беспорядочном смешивании, снижении вспенивания и снижении потребляемой энергии, что особенно важно при увеличении масштабов культивирования.

Переход от магнитных мешалок к системам с прямым приводом оказал заметное влияние на конструкцию сосудов, поскольку в последнем случае привод должен проходить через сосуд. Это несколько усложняет конструкцию, так как возникает необходимость в создании асептической переходной муфты со смазывающимися подшипниками для привода в верхней или нижней крышке сосуда.

Увеличение масштаба культивирования не является пропорциональным процессом. Скажем, преобразование 1-литрового реактора в 1000-литровый не может быть осуществлено простым соответствующим увеличением всех его размеров. Причины этого чисто математические: увеличение диаметра сосуда в 2 раза сопровождается 4-кратным увеличением объема, что различными путями влияет на разные физические параметры системы. Одним из факторов, которые следует принимать во внимание, является отношение высоты к диаметру — один из наиболее важных параметров при создании ферментёров. В системах с пробулькиванием воздуха чем выше ферментёр по отношению к его диаметру, тем лучше, поскольку увеличивается давление на дне сосуда (что стимулирует растворение кислорода) и время жизни пузырьков продлевается. Однако в непробулькиваемых системах, часто используемых при работе с животными клетками и зависящих от поверхностной аэрации, более важным является отношение площади поверхности к высоте жидкости, и это отношение должно поддерживаться около 1:1.

Перенос массы между фазами культуры уже обсуждался в связи с проблемой обеспечения кислородом (см. разд. 2.7). Именно эта характеристика увеличения масштаба требует сверхизошренности при создании культуральных систем для поддержания физиологической адекватности окружающей среды. Под изошренностью в данном случае мы понимаем и специальные конструкции роторов, и подбор систем снабжения кислородом, и выбор формы сосуда, и создание перфузионных контуров, а также развитие совершенно иных концепций создания культур, не использующих реактор с перемешиванием.

4.5. Ферментёры с перемешиванием

Переход от вращательных сосудов с внешним магнитным приводом к ферментёрам, способным увеличивать объем культур от 1 до 1000 л и выше, приводит к следующим модификациям:

- а) Переход от стеклянных сосудов к сосудам из нержавеющей стали.
- б) Переход от переносных систем к стационарным, подсоединение к горячему пару для стерилизации *in situ*, потребность в водяной рубашке или внешнем температурном контроле, необходимость во вспомогательных сосудах для посева клеток, для поддержания среды и системы слива культуры.
- в) Большая сложность систем контроля среды в связи с увеличивающимися требованиями к переносу массы.

На практике максимальный размер вращающих сосудов не превышает 20 л. Выше этого значения создаются сложности, с передвижениями и автоклавированием элементов системы, а также трудности в адекватном перемешивании систем. В продаже имеются ферментёры с мешалками с приводом от двигателя, начиная с объема 500 мл, но эти установки используются главным образом для выращивания бактерий. Очень важным этапом является переход к системам объемом выше 10—20 л, поскольку возрастает стоимость оборудования (например, полная система на 35 л стоит 15 000—20 000 фунтов стерлингов) и появляется потребность в специальных лабораторных приспособлениях (источник горячего пара, водопровод и т. д.). Известен большой набор сосудов, поставляемых фирмами — изготовителями ферментёров, но эти сосуды большей частью разработаны для выращивания бактерий и не идеальны для большинства клеток животных. Однако в последнее время в продажу стали поступать ферментёры, более пригодные для животных клеток, и эти системы включают в себя следующие модификации:

- 1) подходящую мешалку (например, морской винт);
- 2) отсутствие разделяющих перегородок;
- 3) выгнутое дно для лучшего перемешивания при низкой скорости;
- 4) водяную рубашку вместо нагревательной системы температурного контроля погружного типа (для избежания локальных перегревов при низкой скорости вращения);
- 5) мешалку с приводом сверху, чтобы клетки не захватывались участками между движущимися частями.

Пока перемешивание аккуратное и, следовательно, перенос кислорода в сосудах осуществляется без повреждения клеток, отсутствуют и ограничения в увеличении масштаба культуры. Клетки ВНК21 выращивались в ферментёре объемом 2000 л для получения вакцинного вируса ящура. В таких же системах могут выращиваться многие гетероплоидные линии клеток, например Vero и HeLa. Однако, поскольку контролирующие органы требуют, чтобы фармацевтические продукты получали главным образом из нормальных диплоидных клеток (которые не растут в суспензии), единственным способом стимулировать крупномасштабное культивирование является получение препаратов для ветеринарии. Тем не менее существует много областей применения всевозможных продуктов, полученных из разных типов клеток, и для получения этих продуктов используются системы объемом 2—50 л. В настоящий момент важным стимулом развития крупномасштабных культуральных систем стало выращивание клеток гибридом, продуцирующих моноклональные антитела. В культурах клеток выход антител оказывается в 50—100 раз ниже, чем в клетках, пассируемых в

брюшной полости мышей. К настоящему времени потребность в моноклональных антителах ограничивается задачами диагностики и аффинной хроматографии. В дальнейшем несомненно возникнет потребность в этих антителах для терапевтических и профилактических целей. Многие из этих клеток очень хрупки и дают в культурах низкий выход, так что специализированная техника и аппараты, описанные в разд. 4.7, частично предназначены именно для этого типа клеток.

4.6. Проточные культуры

4.6.1. Введение

При субмаксимальных скоростях рост клеток определяется концентрацией одного рост-лимитирующего питательного вещества. Это положение лежит в основе создания хемостата — культуры с фиксированным объемом, в которую с постоянной скоростью поступает среда, смешивается там с клетками и с такой же скоростью оттекает. Рост клеток начинается в непроточной культуре, где инокулят дорастает до максимальной плотности, которая может быть обеспечена рост-лимитирующим фактором (предполагая, что скорость разведения ниже максимальной скорости роста). По мере снижения концентрации рост-ограничивающего питательного фактора снижается и скорость роста клеток, пока она не станет равной скорости разведения суспензии. Когда это происходит, говорят, что культура достигла «равновесного» состояния, поскольку и число клеток, и концентрация питательных веществ далее остаются постоянными.

При достижении равновесия скорость роста (μ) становится равной скорости разведения (D). Скорость разведения является функцией скорости тока среды в единицу времени (f) и объема культуры (V)

$$\mu = D = f/V \text{ сут}^{-1} \quad (8)$$

Поскольку скорость роста зависит от скорости тока среды, можно вычислить среднее время генерации (удвоения) клеток:

$$td = \ln 2/D \quad (9)$$

Альтернативной хемостату системой является турбидостат, в котором плотность клеток поддерживается на определенном уровне путем изменения поступления среды. Плотность клеток (мутность суспензии) измеряется обычно с помощью фотоэлектрического устройства. Когда значение плотности снижается ниже заданного уровня, поступление среды приостанавливается, чтобы дать возможность увеличиться числу клеток. При превышении заданной плотности поступление среды увеличивается, чтобы смыть лишние клетки. Эта система эффективно функцио-

нирует только при скоростях роста, близких к максимальным. В этом на самом деле и заключается преимущество турбидостата над хеомостатом, поскольку последний значительно менее эффективен или контролируем при скоростях роста клеток, близких к максимальным. Более подробно с культивированием животных клеток при постоянном протоке можно ознакомиться, обратившись к обзору Тови [21].

4.6.2. Оборудование

Полная система хеомстата может быть получена от любой из фирм, изготавливающих ферментёры. Такую систему, однако, можно легко создать и в лаборатории (рис. 3.13) [22]. Культуральный сосуд должен иметь боковое горло на требуемом

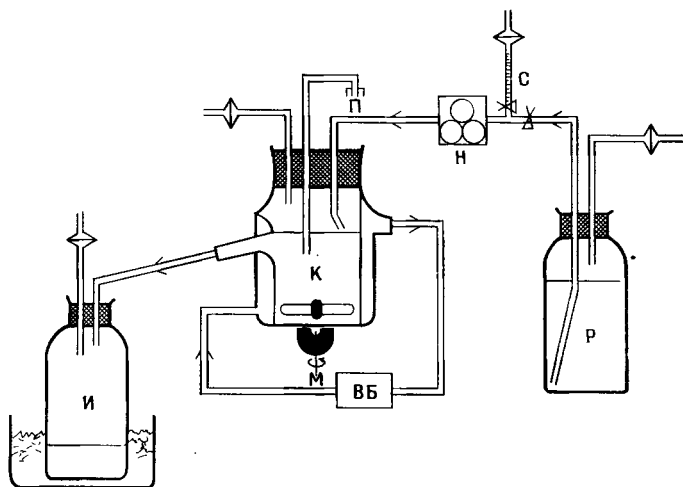


Рис. 3.13. Культуральная система с постоянным протоком. К — культуральный сосуд с водяной рубашкой; ВБ — водяная баня и система циркуляции; И — сосуд для избытка среды; Р — резервуар; Н — насос; П — устройство для отбора проб; С — бюретка для измерения скорости тока жидкости; М — магнитная мешалка.

уровне жидкости, который должен располагаться примерно на половине высоты сосуда. Если отсутствует термостатированная при 37°C комната, можно обойтись водяной рубашкой. Во всем остальном система требует стандартного лабораторного оборудования. Закупорку сосудов можно производить силиконовыми пробками или пробками из белой резины, вставляемыми в отверстия сосудов. Рекомендуется использовать перистальтический насос высокого качества на уровне насосов фирмы Watson-Marlow.

4.6.3. Протокол эксперимента

Для выращивания в рассматриваемой системе рекомендуются клетки LS, HeLa-S3 или постоянные линии лимфобластоидных клеток, таких как L1210. В качестве рост-лимитирующего фактора может быть выбрана какая-либо аминокислота или глюкоза.

- I. Внесите в культуральный сосуд клетки в концентрации 10^5 клеток/мл в предпочитаемой вами среде (например, в MEM с 10% сыворотки и рост-лимитирующим фактором).
- II. Выбранная скорость разведения устанавливается через 24—48 ч после начала роста. Максимальная скорость разведения не должна превышать максимальную скорость роста выбранной линии клеток, которая обычно лежит в диапазоне 14—27 ч (хотя некоторые линии клеток могут удваивать свое количество в течение 9 ч). Следовательно, скорость разведения может изменяться в пределах от $0,1 \cdot \text{сут}^{-1}$ ($\text{td} = 166$ ч) до $1,2 \cdot \text{сут}^{-1}$ ($\text{td} = 14$ ч).
- III. Равновесие культуры достигается в течение 100—200 ч культивирования, хотя это время может растянуться до 400 ч, особенно при низкой скорости разведения. Достижение равновесия можно определить по отсутствию изменений концентрации клеток в течение суток в пределах экспериментальной ошибки.
- IV. Культура может поддерживаться неограниченно долго при условии сохранения стерильности и сохранности всех компонентов. Тем не менее следует время от времени прекращать культивирование при чрезмерном прикреплении клеток к сосуду на границе воздушной и водной фаз. Удовлетворительным считается период культивирования 1000 ч.
- V. После достижения равновесия можно изменить скорость потока и изучать ответ клеточной популяции в процессе установления нового равновесного состояния.
- VI. Помимо рутинного подсчета числа клеток можно также провести измерения гомогенности клеток и среды. Так, например, должны быть хорошо совпадающими размер и химический состав клеток. Можно измерять также концентрацию некоторых компонентов среды (например, глюкозы, какой-либо аминокислоты, молочной кислоты) для демонстрации постоянства культуры в течение долгого периода времени.

4.6.4. Области использования

- а) Легко доступный постоянный источник клеток.
- б) При достижении оптимальных условий или того или иного физиологического состояния можно использовать культу-

ру для генерации продукта, как уже было показано для вирусов и интерферона [21]. Для многих целей требуется 2-этапный хеостат, поскольку разные оптимальные условия могут потребоваться для роста клеток (1 этап) и образования продукта (2 этап).

4.7. Ферментёр с эрлифтом

Устройство ферментёра с эрлифтом основано на принципе колонки с пробулькиванием воздуха как для перемешивания, так и для аэрации культуры. Вместо механического перемешивания клеток к основанию культурального сосуда поступают пузырьки воздуха. Внутренний (создающий тягу) цилиндр помещается внутрь культурального сосуда, и перемешивание осуществляется благодаря тому, что пузырьки воздуха поднимают среду (аэрированная среда обладает меньшей плотностью, чем неаэрированная). Среда и клетки, изливающиеся из верхней части тягового цилиндра, циркулируют затем к его основанию по наружной части сосуда. Количество потребляемой системой энергии (сжатый воздух) очень невелико, силы сдвига отсутствуют, и этот метод представляется идеальным для хрупких животных и растительных клеток. Кроме того, поскольку кислород постепенно поступает в культуру, большое количество пузырьков создает высокую скорость переноса массы. Фирма LH Fermentation поставляет культуральные блоки (такие, как на рис. 3.14) размерами от 2 до 90 л. Одним из недостатков этой системы является более или менее линейное увеличение размеров при увеличении масштабов культивирования (ферментер на 90 л требует помещения высотой около 4 м). Представится ли возможным использовать множественные тяговые цилиндры и тем самым сильно увеличить диаметр сосуда, остается пока экспериментальной задачей.

4.8. Инкапсулированные клетки

Заключение клеток в полутвердый матрикс или сферы бывает необходимо во многих случаях, но главной целью всегда остаются стабилизация клеток и защита их от субоптимальных условий. Клетки могут быть иммобилизованы путем адсорбции, с помощью ковалентного связывания, образования поперечных сшивок или путем «запутывания» в полимерном матриксе. Для иммобилизации можно использовать желатин, полилизин, альгинат или агарозу; выбор материала зависит главным образом от решаемой задачи. Эта техника получила распространение для защиты клеток при транспортировке или почтовом обмене между лабораториями, для хранения клеток при 4°C в течение длительного периода (5 нед), для предотвращения иммунного отторжения трансплантированных клеток, для защиты хрупких клеток (например, клеток гибридом) от механического стресса

в установках для крупномасштабного культивирования [23, 24]. Последнее не только позволяет использовать такое оборудование, но и обеспечивает производство гормонов, антител, иммунохимических агентов и ферментов в течение значительно более долгого периода, чем это возможно в гомогенной суспензионной культуре. Матрикс не препятствует свободной диффузии пи-

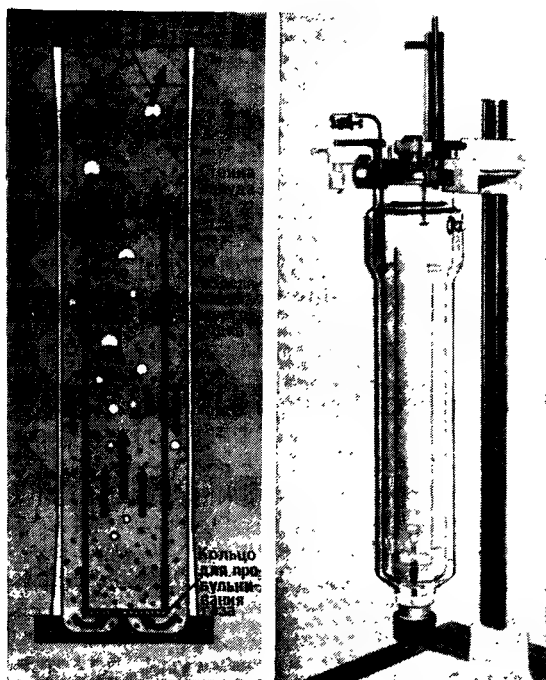


Рис. 3.14. Принцип ферментёра с эрлифтом.

тательных веществ и образующихся продуктов между окружающей средой и микроокружением иммобилизованных клеток.

Альгинат представляет собой полисахарид, поперечно сшиваемый ионами Ca^{2+} . Скорость образования поперечных сшивок зависит от концентрации Ca^{2+} (так, в присутствии 10 мМ CaCl_2 для образования сшивок требуется ~ 30 мин). Рекомендуется следующая методика заключения клеток в альгинат. Клетки суспендировать в изотоническом растворе NaCl , забуференном трисом (1 мМ) и содержащим 4%-ный альгинат натрия. Полученную суспензию добавлять по каплям в перемешиваемый раствор, содержащий изотонический раствор, 1 мМ трис-буфер pH 7,4 и 10 мМ CaCl_2 . Образующиеся частицы имеют диаметр 2—3 мм. Заклученные в частицы клетки можно высвободить, растворяя полимер 0,1 М ЭДТА или 35 мМ цитратом натрия. Не-

достатком альгината является необходимость присутствия Ca^{2+} и отсутствия фосфата, а также то, что крупные молекулы, такие как моноклональные антитела, не могут диффундировать сквозь матрикс. Наиболее подходящей альтернативой альгинату, лишенной вышеуказанных недостатков, оказывается суспензия агарозы в парафиновом масле. Для ее приготовления агарозу необходимо растворить в лишенном Mg^{2+} и Ca^{2+} ФСБ до концентрации 5% при 70 °С, охладить раствор до 40 °С и смешать с клетками, суспендированными в привычной для них ростовой среде. Полученную смесь смешать с равным объемом парафинового масла и эмульсифицировать на Вибро-миксере. Полученную эмульсию охладить в ледяной бане, добавить ростовой среды и центрифугированием удалить масло. Частицы (80—200 мкм) промыть средой, центрифугировать и после удаления остаточного масла перенести в культуральный сосуд.

Использование заключенных в полимерный матрикс клеток в ферментёрных культурах представляется заманчивой техникой получения клеточных продуктов. Во многих случаях в этом методе могут быть использованы преимущества культуры с микроносителями (гранулы с растущими на их поверхности клетками) в смене среды и в соотношении объемов клеток и среды. Кроме того, заключение клеток в матрикс может быть использовано для облегчения перфузии или смены среды, и продукты можно будет получать свободными от клеток.

Литература

1. Griffiths J. B. (1972). *J. Cell Sci.*, **10**, 512.
2. Good N. E. (1966). *Biochemistry*, **5**, 467.
3. Leibovitz A. (1963). *Am. J. Hyg.*, **78**, 173.
4. Spier R. E., Griffiths J. B. (1984). *Dev. Biol. Stand.*, **55**, 81.
5. Toth G. M. (1977). In: *Cell Culture and its Applications*, Acton R. T., Lynn J. D. (eds.), Academic Press, NY, p. 617.
6. Griffiths J. B. (1984). *Dev. Biol. Stand.*, **55**, 113.
7. Maroudas N. G. (1975). *J. Theor. Biol.*, **49**, 417.
8. Kruse P. J., Keen L. N., Whittle W. L. (1970). *In Vitro*, **6**, 75.
9. Corbiel M., Trudel M., Payment P. (1979). *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 91.
10. Skoda R., Pakos V., Hormann A., Spath O., Johansson A. (1979). *Dev. Biol. Stand.*, **42**, 121.
11. Munder P. G., Modolell M., Wallach D. F. H. (1971). *FEBS Lett.*, **15**, 191.
12. Jensen M. D. (1981). *Biotech. Bioeng.*, **23**, 2703.
13. Burbidge C., Darcey I. K. (1984). *Dev. Biol. Stand.*, **55**, 255.
14. Whiteside J. P., Spier R. E. (1981). *Biotech. Bioeng.*, **23**, 551.
15. Weiss R. E., Schleiter J. B. (1968). *Biotech. Bioeng.*, **10**, 601.
16. van Wezel A. L. (1967). *Nature*, **216**, 64.
17. Griffiths J. B., Thornton B. (1982). *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **32**, 324.
18. Spier R. E., Whiteside J. P. (1984). *Dev. Biol. Stand.*, **55**, 151.
19. Capstick P. B., Garland A. J., Masters R. C., Chapman W. G. (1966). *Exp. Cell Res.*, **44**, 119.
20. Feder J., Tolbert W. R. (1983). *Sci. Am.*, **248**, 24.
21. Tovey M. G. (1980). *Adv. Cancer Res.*, **33**, 1.
22. Pirt S. J., Callow D. S. (1964). *Exp. Cell Res.*, **33**, 413.
23. Nilsson K., Mosbach K. (1980). *FEBS Lett.*, **118**, 145.
24. Nilsson K., Scheirer W., Merton O. W., Ostberg L., Liehl E., Kättinger H. W. D., Mosbach K. (1983). *Nature*, **302**, 629.

СОХРАНЕНИЕ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КЛЕТОК

Р. Хэй

1. Введение

К настоящему времени из тканей человека и других многоклеточных животных получены тысячи различных клеточных линий¹⁾. Многие из них происходят из нормальных тканей и обладают определенным ограниченным потенциалом удвоения. Другие линии клеток могут размножаться неограниченно либо потому, что они возникают благодаря изменениям в первичной клеточной продукции, либо потому, что они исходно получены из опухолевых тканей. И линии клеток с ограниченным потенциалом размножения, и постоянные линии могут быть размножены для получения большого количества клеток, заморожены и затем охарактеризованы для широкого использования в научных исследованиях.

Преимущества работы с хорошо изученными линиями клеток, не зараженных микроорганизмами, представляются бесспорными. К сожалению, приходится постоянно иметь дело с трудностями, связанными с использованием клеточных линий. Многочисленные случаи, когда обмен клеточными линиями между разными лабораториями приводил к загрязнению клеток клетками других линий, изложены и проанализированы в других работах [2, 3]. Например, линии клеток человека оказались клетками обезьяны, мыши или мангусты, а другие линии клеток, предположительно обезьяны и норки, были идентифицированы как клетки крысы и собаки [2]. Проблема межвидового перекрестного загрязнения культивируемых линий клеток человека была поставлена около 20 лет назад, и этой теме посвящены детальные обзоры [4]. Потери времени и ресурсов, вытекающие из этой проблемы, поистине неисчислимы.

Бактериальные и грибковые загрязнения представляют дополнительные трудности, но в большинстве случаев они ярко проявляются и легко выявляются и, следовательно, приводят к менее серьезным последствиям, чем более незаметное заражение микоплазмой. Многими специалистами в области биологии микоплазмы в течение ряда лет было неоднократно показано

¹⁾ Использование терминов «линия клеток» и «штамм клеток» проводится в соответствии с рекомендациями комитета Ассоциации Культуры Тканей [1].

[5, 6], что присутствие этих микроорганизмов в культивируемых клетках практически сводит на нет многие результаты научных исследований, проведенных с этими линиями клеток. Тем не менее сложность выявления этих микроорганизмов и преобладание зараженных культур среди объектов исследований показывают, что важность этой проблемы невозможно переоценить.

В этой главе будет приведено описание процедур сохранения и получения характеристик клеточных линий и гибридом Американской коллекции типовых культур (АТСС). Изложенные в главе материалы основаны на результатах исследований последних 20 лет, когда стали ясны сложности, связанные с микробным, а также перекрестным загрязнением клеток, и увеличилась потребность в хорошо охарактеризованных линиях клеток.

2. Создание банка линий клеток

Линии клеток, представляющие интерес, отбираются учеными и консультантами АТСС по результатам постоянного анализа литературы. Создатели новых линий часто сами предлагают эти линии для рассмотрения. В ряде работ изложена детальная информация, касающаяся специфических групп приобретаемых клеток [7—9]. В общем случае начальные культуры или ампулы получают от донора и размножают в соответствии с инструкциями для получения первого «пробного» замораживания. Культуры, полученные из пробного материала, подвергаются тщательному изучению по изложенным ниже методикам. Если по материалам испытаний клетки заслуживают внимания, то их дополнительно размножают для получения запаса для посева и запаса для распределения. Особо отметим, что основные результаты анализа свойств клеток получены на популяции начального запаса ампул. Запас для распределения состоит из ампул, предназначенных для рассылки по просьбе исследователей. Эталонный запас для посева, с другой стороны, сохраняется для распределения по мере истощения первичного запаса.

Такая процедура разработана для удовлетворения потребностей большого центрального банка клеток. Она, однако, применима и в небольших лабораториях. Даже когда количество клеток линий и использующих эти линии исследователей невелико, важно отделить «посевной запас» от «рабочего запаса» или «запаса для распределения». В противном случае частые замены культивируемого материала, рекомендуемые для предотвращения сдвига фенотипа или старения, могут привести к истощению ценного посевного запаса, который трудно или дорого восстановить.

Эти различные этапы создания банка клеточных линий суммированы на рис. 4.1. Важно уяснить себе, что охарактеризованный запас для посева служит замороженным «резервуаром» для пополнения запаса при распределении в течение многих лет. Поскольку ампулы посевного запаса используются для получения материала для распределения, получатель может быть уверен, что все полученные культуры соответствуют такому, полученным 2, 5, 10 и более лет назад. Это наиболее критический момент в создании процедуры для получения банка клеток. Проблемы, связанные с генетической нестабильностью,

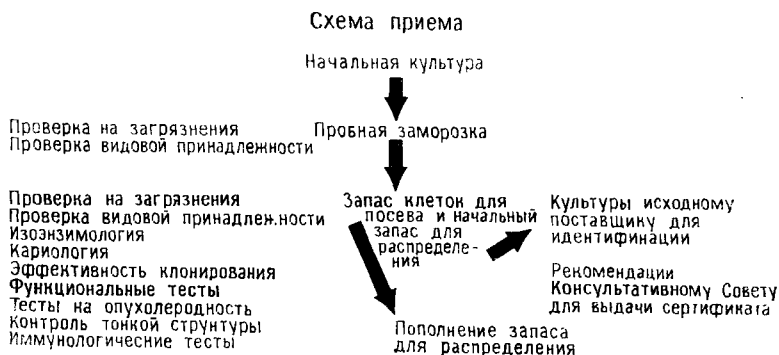


Рис. 4.1. Схема, иллюстрирующая рекомендуемый план приема клеточных линий в банк для общего распределения. Определение по крайней мере двух характеристик, приведенных с левой стороны схемы, должно проводиться перед выходом из лаборатории любой линии клеток.

отбором клеточных линий, старением и трансформацией, можно решить, если строго придерживаться этого принципа.

Работы со всеми первичными культурами и линиями клеток, для которых не показано специфическими методами отсутствие примесных биологически вредных агентов, следует проводить в ламинарном боксе II класса (BS5726; NIH Spec. 03-112). Эта предосторожность защитит персонал, работающий с культурами клеток, и лабораторию от инфекции и загрязнений. Более того, есть рекомендации о соблюдении подобных предосторожностей при работе с линиями опухолевых клеток человека из-за присутствия в клетках онкогенов и показанной недавно возможности трансфекции, по крайней мере в системе клеточных культур.

3. Замораживание клеток и оценка выхода

Повреждения клеток, происходящие при замораживании и оттаивании культуры, обусловлены, по-видимому, внутриклеточными кристаллами льда и осмотическими эффектами. До-

бавление криопротекторов, таких как диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин, а также прибор оптимальных скоростей замораживания и оттаивания сводят повреждения клеток к минимуму.

Возможно кратковременное сохранение замороженных клеток в шкафу глубокого охлаждения (-75°C), но значительно лучше хранить клетки в жидком азоте (-196°C) либо в его парах (-120°C). Метод замораживания в жидком азоте предпочтительнее не только из-за более низкой температуры и, следовательно, почти неограниченного срока хранения, но и вследствие полного отсутствия риска механического повреждения клеток. Хранение ампул в жидком азоте со всей очевидностью необходимо при создании любых банков клеток, за исключением самых маленьких.

Специально остановимся на двух проблемах техники безопасности при работе с клеточными линиями. Во-первых, подвергаются опасности сотрудники, размораживающие ампулы; жидкий азот может проникать в ампулы через микротрещины, образованные при хранении. При размораживании быстрое испарение азота внутри ампулы может приводить к ее взрыву и разлетанию стекол. К счастью, частота таких случаев резко снижается по мере того, как оператор накапливает опыт запаивания и проверки ампул (разд. 3.1.1 и 3.3). Однако даже при самой высокой квалификации обслуживающего персонала опасность взрыва остается. Поэтому извлечение ампул из азота должно проводиться в защитной маске.

Во-вторых, ДМСО может растворять органические вещества и благодаря проникновению через резину и кожу переносить их в кровь. Поэтому при работе с ДМСО следует соблюдать особые меры предосторожности, чтобы избежать попадания в ДМСО вредных химических соединений и свести до минимума его контакт с кожей.

3.1. Оборудование

3.1.1. Ампулы, маркировка и устройство для запаивания

Вопрос об использовании стеклянных или пластиковых ампул следует решать исходя из масштабов заморозки и предназначения замораживаемых клеток. Стерильные стеклянные ампулы заполняют суспензией клеток и прочно запаивают в относительно больших количествах. Такие ампулы рекомендуются для больших партий клеток, предназначенных для длительного использования или дальнейшего распределения. Меньшее количество пластмассовых ампул, более удобных в обращении, чем стеклянные, проще маркировать и закрывать. В некоторых случаях могут возникнуть проблемы с запаиванием, особенно в

случаях необходимости частой сортировки материала или подготовки его для отправки в другие организации.

Маркировка ампул требует специального рассмотрения, поскольку четкость надписей может пропадать в ходе замораживания ампул, открывания и закрывания бокса с ампулами, их переноса между холодильниками или контейнерами для перевозки и т. д. Использование бумажных ярлыков, шариковых

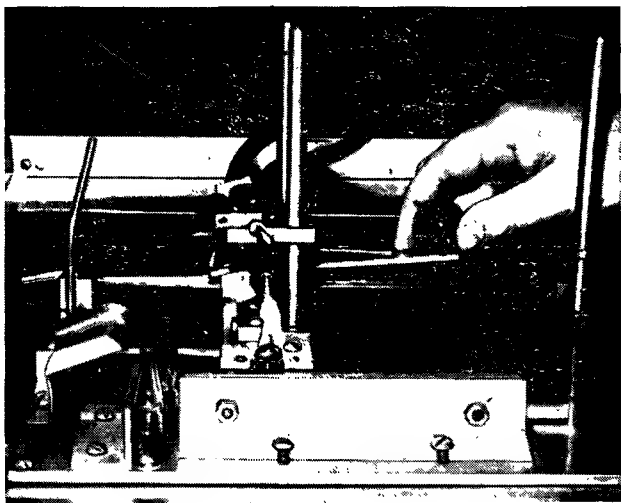


Рис. 4.2. Устройство для запаивания стеклянных ампул. Ампулы перемещаются справа налево и автоматически поворачиваются, при этом кончик каждой ампулы нагревается в пламени. При максимальной температуре кончик оттягивается вверх и размягченное стекло запаивается (см. слева). Для правильного запаивания необходимо соблюдать определенную скорость перемещения рукоятки.

ручек и стандартных лабораторных маркеров нежелательно, особенно в случае стеклянных ампул. Последние нужно надписывать керамическими чернилами, которые могут быть отождествлены на поверхности ампул. Надписывать можно от руки ручкой с пером, а в случае крупных партий ампул можно использовать механический отметчик (например, выпускаемый фирмой Mag-kem Co., Keene, New Hampshire).

Запаивать ампулы лучше всего путем оттягивания их шеек, когда они вращаются в наиболее горячей зоне пламени от газокислородной горелки. Техника запаивания оттягиванием считается более надежной, поскольку в этом случае снижается риск образования капиллярных каналов в запаянном кончике. Горелку для ручного запаивания можно приобрести в магазине

научного оборудования. Для запаивания больших партий ампул горелку можно присоединить к полуавтоматическому устройству для запаивания (рис. 4.2), поставляемому фирмой Morgan Sheet Metal Co., Sarasota, FL, USA, под названием запаиватель Bench, модель 161.

3.1.2. Аппараты для медленного замораживания

Оптимальная скорость замораживания клеточных линий (обычно около $-1^{\circ}/\text{мин}$) может быть достигнута при использовании оборудования разной сложности, начиная от специально приспособленного ящика из пенопласта и кончая полностью программируемым морозильным блоком. Ящик из пенопласта должен иметь толщину стенок около 2 см, чтобы добиться скорости охлаждения $1^{\circ}/\text{мин}$ при помещении в механический морозильник с температурой -70°C . Фирмы, производящие рефрижераторы с жидким азотом, предлагают за умеренную цену приставку к рефрижератору, с помощью которой можно медленно заморозить небольшую партию (1—9) ампул. Для тех, кто замораживает более крупные партии ампул или нуждается в более точном контроле скорости замораживания, можно рекомендовать морозильные блоки с постоянной или программируемой скоростью замораживания (Cryo-Med; Planer; Union Carbide).

3.1.3. Хоподипьники с жидким азотом

Выбор того или иного холодильника производится на основе экономических расчетов с учетом расходования жидкого азота, начальных затрат, желаемой емкости хранилища и удобства закладки материала и его извлечения. Морозильники с наиболее узкими входными отверстиями, как правило, наиболее экономичны. Некоторые более крупные установки снабжены подъемной площадкой для упрощения операций.

Ампулы с клетками можно хранить в жидком азоте либо в его парах. Последний метод удобнее, так как, если у ампул остаются капиллярные проходы, они не заполняются жидким азотом, и тем самым ликвидируется опасность взрыва при размораживании. Несколько более высокая температура паров азота не является, по-видимому, отрицательным фактором, за исключением, может быть, случаев длительного хранения запасов клеток, предназначенного для посева.

Полезными дополнительными устройствами для холодильников являются роликовые опоры для удобства перемещения, системы сигнализации для оповещения об угрожающе низком уровне жидкого азота, а также системы укладывания ампул (у более крупных рефрижераторов) для облегчения их хране-

ния и извлечения. Даже при наличии автоматических систем контроля следует регулярно вручную проверять уровень жидкого азота с помощью погружного щупа. Электронная система может отказать — такое случается и с системой автоматического заполнения, и с дублирующей системой оповещения.

3.2. Подготовка и замораживание

Для замораживания следует отбирать культуры на поздней логарифмической или предконфлюентной фазах роста, поскольку именно в таких культурах клетки наиболее жизнеспособны. В случае необходимости культуру обрабатывают трипсином для получения однородной суспензии одиночных клеток, как и в случае обычного пересева, и далее проводятся следующие операции:

- I. Непосредственно перед использованием подготовьте среду для заморозки путем простого смешивания свежей ростовой среды с выбранным криопротектором. Концентрация криопротектора слабо зависит от типа клеток и природы криопротектора и обычно используется в диапазоне от 5 до 10% по объему.
- II. Осадите клетки центрифугированием при 200 g в течение 10 мин и ресуспендируйте осадок в нужном объеме среды для заморозки при комнатной температуре. Наиболее удобно доводить концентрацию клеток до 10^6 — 10^7 клеток/мл, но в некоторых случаях эту величину приходится на порядок снижать или увеличивать.
- III. Если общий объем суспензии велик (например, при препаративном замораживании), поддерживайте клетки в суспензии мягким перемешиванием в подходящем сосуде, снабженном автоматическим шприцем Корнуэлл. Если клетки суспендированы в небольшом объеме (10—20 мл), используйте шприц с иглой калибра 18 или канюлей. В течение всего процесса постоянно встряхивайте суспензию.
- IV. При необходимости поддерживайте pH суспензии, пропускаемая через нее смесь водонасыщенного воздуха с CO_2 .
- V. Разлейте клеточную суспензию (по 1 мл) по ампулам. Это нужно делать быстро, так как клетки в шприце Корнуэлл быстро оседают под действием силы тяжести; чтобы в ампулах получились суспензии одинаковой плотности, необходимо проводить разлив быстро и ритмично.
- VI. Запаяйте каждую ампулу, поместите их в специальный держатель или на какой-либо лоток и полностью погрузите в водный раствор метиленовой синьки (0,05%) при 4°C. Через 30—45 мин извлеките ампулы, промойте холодной водопроводной водой и выбросьте ампулы, в которые проник краситель.

- VII. Тщательно высушите ампулы и начните медленное замораживание. Оптимальная скорость замораживания составляет обычно $1^{\circ}/\text{мин}$, но может быть иной в зависимости от вида клеток, так что перед замораживанием большого количества клеток ее лучше подобрать эмпирически.
- VIII. Когда температура ампул достигнет $(-50) - (-70)^{\circ}\text{C}$ и ниже, извлеките их из охлаждающего устройства и быстро перенесите в рефрижератор с жидким азотом.
- IX. Отметьте место хранения ампул и тип содержащихся в них клеток. Для этой цели следует использовать две отдельные картотеки, составленные по природе хранящихся клеток и по положению сохраняемых ампул в рефрижераторах.

3.3. Размораживание и оценка выхода клеток

Для оптимального восстановления жизнеспособности клеток необходима высокая скорость их размораживания.

- I. Надев маску, защищающую лицо и шею, извлеките нужные ампулы и быстро поместите их в теплую водяную баню (37°C). Если ампулы хранились в жидком азоте (а не в его парах), каждую ампулу надо размораживать независимо, помещая ее под слой воды толщиной около 10 см при 37°C в цилиндр объемом 1,5—2 л с плотно закрывающейся крышкой.
- II. Встряхивайте ампулу с содержимым 20—60 с, пока суспензия полностью не растает.
- III. Погрузите ампулу в 70%-ный этанол при комнатной температуре.
- IV. Надпилите ампулы небольшой пилочкой, предварительно обработанной этанолом. В случае предварительно надпиленных ампул такая обработка не требуется.
- V. Используйте стерильное полотенце для вскрытия ампулы. Резко отломайте шейку ампулы по месту надпила.
- VI. Перенесите содержимое ампулы в центрифужную пробирку или культуральный сосуд стерильной пастеровской пипеткой или шприцем. Добавьте 10 мл полной ростовой среды. В ряде случаев на этом этапе лучше добавлять среду постепенно, в течение 1—2 мин.
- VII. Центрифугируйте 10 мин при 200 g. К осадку добавьте свежую среду и перемешайте суспензию. В некоторых случаях центрифугирование может быть опущено, поскольку остаточная концентрация криопротектора мала; при центрифугировании же клетки могут значительно повреждаться.
- VIII. Начните стандартное культивирование клеток. Если этап центрифугирования был опущен, смените среду через 24 ч.

Для оценки выхода клеток после замораживания можно использовать много методов. Естественно, что это лишь первый этап оценки качества клеток, предпринимаемый после хранения.

3.3.1. Исключение красителя для определения жизнеспособности клеток

Весьма приблизительная оценка жизнеспособности клеток в суспензии может быть получена с помощью теста на исключение красителя. В суспензию клеток добавляется водный раствор красителя, и на гемоцитометре (камера Горяева) подсчитывается относительное количество неокрашиваемых клеток. Для этой цели наиболее часто применяются трипановый синий или эритрозин В. Известно, что первый краситель обладает высоким сродством к растворенным белкам (например, к белкам сыворотки). Это может снизить точность оценки, если концентрация сыворотки в суспензии превышает 1%. Раствор эритрозина В прозрачен, что позволяет легко обнаружить рост микробов в концентрированном растворе или образование осадка. При использовании концентрированного раствора трипанового синего это оказывается не так просто. Рекомендуется следующая процедура оценки жизнеспособности клеток по исключению красителя.

- I. Получите однородную суспензию клеток в ростовой среде, используя любой стандартный метод. Для оценки процесса замораживания рекомендуется объединить содержимое примерно 5% всех ампул.
- II. Разбавьте точно измеренный объем клеточной суспензии исходным раствором красителя. Обычно исходный раствор содержит 100 мг эритрозина В на 100 мл изотонического ФСБ, доведенного до pH 7,2—7,4 с помощью 1 М NaOH. Для точности и легкости подсчета конечная концентрация клеток должна составлять $0,3\text{--}2 \cdot 10^6$ клеток/мл.
- III. Подсчитайте относительное количество окрашенных клеток, имея в виду, что использование для подсчета большего числа клеток обеспечит более точную оценку. Подсчет клеток лучше всего производить в течение 1—5 мин после смешивания суспензии клеток с красителем.

3.3.2. Эффективность клонирования

Тест на исключение красителя обычно дает завышенную оценку жизнеспособности клеток. Для линий прикрепляющихся клеток более точная оценка выживаемости может быть получена путем анализа эффективности клонирования размороженных клеток. При этом следует помнить, что на полученном результате скажутся вид ростовой среды, выбор субстрата, на кото-

ром будут клонированы клетки, продолжительность инкубации и т. д. Поэтому при сравнении различных препаратов замороженных клеток одной и той же линии следует стандартизировать условия тестирования. Ниже представлена схема анализа клонального роста клеток, рекомендуемая АТСС.

- I. Объедините содержимое размороженных ампул (примерно 5% от всей партии) и проведите серийное разбавление культуры для получения суспензий 10^2 — 10^4 клеток/культура в зависимости от линии клеток, размера культуральной поверхности и ожидаемого результата. Так, клетки с высокой эффективностью клонирования следует высевать на чашки диаметром 9 см по 10 клеток, 100 клеток, 1000 клеток и 10 000 клеток.
- II. Проведите серийное 10-кратное разбавление клеток на каждом этапе путем переноса 1 мл суспензии в 9 мл полной ростовой среды. Полулогарифмическое разведение осуществляется путем переноса 1 мл суспензии в 2,16 мл культуральной среды. Для перемешивания клеток и следующего этапа разведения на каждом этапе серийного разведения используйте новую стерильную пипетку того же объема.
- III. По 1 мл полученных разведений, начиная с самых низких концентраций, разлейте в каждый из трех сосудов Т-75 (или других подходящих культуральных сосудов), содержащих по 8 мл культуральной среды, и инкубируйте при 37 °С.
- IV. Смените среду в полученных культурах на четвертый или пятый день и далее меняйте среду каждый третий или четвертый день.
- V. После 12—14 сут культивирования слейте среду и зафиксируйте клетки 10%-ным раствором формальдегида или другим фиксатором.
- VI. Удалите фиксатор, осторожно ополосните клетки несколькими сменами водопроводной воды и окрасьте 1%-ным водным раствором толудинового синего или другим простым красителем в течение 1—5 мин.
- VII. Удалите краситель, смойте оставшийся раствор водопроводной водой, с помощью препаровальной лупы подсчитайте клоны, содержащие 16 и более клеток.
- VIII. Подсчитайте эффективность клонирования по формуле: $\text{число клонов/число посеянных клеток} \times 100\%$.

3.3.3. Пролиферация в массовой культуре

Жизнеспособность размороженных клеток, как зависящих от субстрата, так и растущих в суспензии, можно также оценивать по их пролиферации в течение первых 1—2 нед после размораживания. Рекомендуется следующая процедура:

- I. Суспензию клеток (5% всей партии замороженных ампул) расseyте с различной плотностью в одинаковые культуральные сосуды (например, флаконы Т-25). В одни флаконы, например, посадите столько клеток, чтобы через 7 сут культура достигла полного монослоя или максимальной плотности. В другие флаконы — вдвое большее количество клеток, а в третьи — в 3—5 раз больше клеток, чем в первые (в зависимости от числа жизнеспособных клеток).
- II. Через 4 сут смените среду (или добавьте свежей среды, если клетки растут в суспензии).
- III. Соберите клетки из всех трех наборов культур стандартной трипсинизацией, если клетки прикреплены к субстрату, или отберите определенную часть суспензионной культуры и подсчитайте число клеток с помощью гемоцитометра или электронного счетчика клеток.
- IV. Определите степень увеличения количества клеток (отношение числа полученных клеток к числу посеянных) и сравните полученные результаты с теоретически рассчитанными результатами для клеток на логарифмической или предконфлюентной фазах роста.

Типичные результаты всех тестов, приведенных выше для большого количества клеточных линий, можно найти в каталоге линий II ATCC [8].

4. Определение качества клеточных линий

Помимо оценки выхода клеток после замораживания жидким азотом необходима проверка клеток и по другим параметрам, включая подтверждение вида и доказательство отсутствия загрязнения грибами, бактериями и микоплазмой.

4.1. Контроль

Тип клеток, от которого ведет начало линия, может быть подтвержден рядом иммунологических тестов, анализом изоферментного состава и/или цитогенетическими методами [10]. Преимущества и проблемы, связанные с использованием каждого из этих методов, будут рассмотрены в соответствующих разделах.

4.1.1. Окрашивание флуоресцентными антителами

Метод непрямой окраски флуоресцентными антителами используется в ATCC в качестве одного из способов подтверждения вида линии клеток. Техника окрашивания включает два этапа. На первом из них из сыворотки кролика получают ви-

доспецифические антитела, которыми окрашивают исследуемые клетки (табл. 4.1). Параллельно окрашивают клетки, заведомо окрашивающиеся (положительный контроль) или неокрашивающиеся (отрицательный контроль) этими антителами. На втором этапе клетки обрабатывают анти-кроличьими антителами козы, связанными с флуоресцентным красителем изотиоцианатом флуоресцеина (ФИТЦ). Вторые антитела связываются с

Таблица 4.1. Получение антисывороток к культивируемым клеткам

1. Соберите клетки с поверхности культуральной посуды с помощью раббера.
2. Трижды промойте клетки суспендированием их в растворе Хэнкса¹⁾ и центрифугированием при 200 g в течение 10 мин.
3. Ресуспендируйте в растворе Хэнкса до конечной концентрации $5 \cdot 10^5$ клеток/мл (первая неделя), 10^6 клеток/мл (вторая неделя) и 10^7 клеток/мл (третья неделя).
4. Введите по 1 мл суспензии в каждую краевую ушную вену здоровых кроликов дважды в неделю в течение 3 нед, увеличивая каждую неделю дозу клеток, как указано в п. 3.
5. Проведите три или более подхлеста, вводя в каждое ухо по 1 мл суспензии клеток в концентрации 10^7 клеток/мл еженедельно.
6. После третьего подхлеста соберите сыворотку и сделайте серийные разведения. Смешайте разведения антисыворотки с равным объемом суспензии клеток (10^6 клеток/мл) и оцените жизнеспособность клеток, пользуясь описанным ранее методом исключения красителя.
7. Если титр антисыворотки удовлетворителен (1:8 или более), соберите кровь пункцией сердца, дайте образоваться сгустку в течение 1—2 ч при комнатной температуре и центрифугируйте 15 мин при 200 g.
8. Удалите сыворотку, инактивируйте комплемент нагреванием при 56°C в течение 30 мин, проведите соответствующее разведение и разделите на порции по 0,2 мл для хранения при -70°C .

¹⁾ Все растворы готовятся на бидистиллированной воде (БВ), перегнанной в стеклянной посуде, за исключением случаев, указанных особо. Для более подробного описания см. [10].

антителами кролика, уже прикрепившимися к исследуемым клеткам. Полученные комплексы антиген—антитело выявляются в люминесцентном микроскопе по флуоресценции антител, связанных с ФИТЦ.

Для подтверждения вида проверяемой линии клеток рекомендуется следующая процедура:

- I. Клетки трипсинизируйте, если это необходимо, и трижды промойте, суспендируя их в ФСБ, pH 7,5, и центрифугируя для получения осадка.
- II. Ресуспендируйте промытые клетки в ФСБ до конечной плотности $3\text{—}4 \cdot 10^6$ клеток/мл.
- III. Смешайте 0,1 мл клеточной суспензии с 0,1 мл разбавленной антисыворотки и поместите во влажную инкубационную камеру при комнатной температуре на 30 мин. Нужное разведение антисыворотки подбирается эмпириче-

ски для каждого препарата антисыворотки с использованием клеток положительного контроля. Неспецифическая адсорбция преодолевается обычно дополнительным разведением сыворотки.

- IV. Обработанные клетки промойте для удаления неадсорбированной сыворотки трехразовым переосаждением в ФСБ и затем инкубируйте 30 мин в темноте с 0,1 мл конъюгированных с ФИТЦ антикروличьих антител козы (коммерческий препарат).

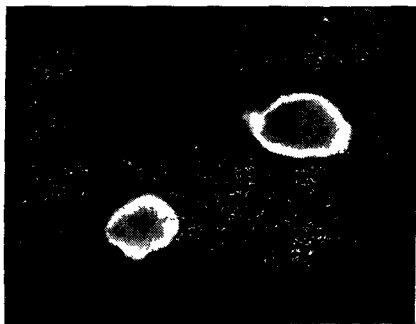


Рис. 4.3. Непрямой флуоресцентный тест с антителами для определения вида клеток. Обратите внимание на флуоресцентный ореол вокруг клеток, показывающий типично положительную реакцию (Фотография любезно предоставлена М. Л. Мэси.)

- V. После трех конечных дополнительных циклов промывания ФСБ каплю суспензии промытых клеток заключите под покровное стекло. Препарат изучается во флуоресцентном микроскопе при увеличении 500 $\times$ с использованием возбуждающего фильтра BG 12 и запирающего фильтра № 50 (микроскоп Zeiss Universal с эписвещением).

- VI. Положительная реакция выявляется в виде зеленой флуоресценции по периферии клеток (рис. 4.3).

- VII. В каждом тесте помимо исследуемых клеток проверяются клетки близкородственного вида и неродственные клетки.

Этот метод представляет собой модификацию метода Стулберга [10]. Он имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, более прост и позволяет идентифицировать мельчайшие клеточные примеси в исследуемой популяции. Стулберг отмечал, что при определенных условиях разрешения предложенный метод позволяет выявить одну чужеродную клетку в популяции из 10 000 клеток.

4.1.2. Спектры изоферментов

Анализ изоферментов, проведенный в гомогенатах линий клеток 25 видов, показал, что этот биохимический признак можно использовать для подтверждения вида [11]. Определяя спектры трех изоферментных систем (глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (ГФД), лактатдегидрогеназы (ЛД) и нуклеозидфосфоорилазы (НФ)) с помощью вертикального электрофореза в крахмальном геле, можно с высокой степенью надежности оп-

ределить вид, от которого происходит линия клеток. Этот метод относительно прост, дает воспроизводимые результаты и не требует дорогого оборудования.

Метод получения экстрактов клеток приведен в сжатой форме в табл. 4.2. Состав исходных буферов для электрофореза в крахмальном геле приведен в табл. 4.3. Компоненты для электрофоретического разделения и выявления в геле трех ферментов представлены в табл. 4.4.

Рекомендуется следующий порядок приготовления крахмального геля:

- I. Суспендируйте 60 г крахмала для электрофореза в 500 мл соответствующего буфера и получите однородную суспензию путем перемешивания при нагревании до 90 °С. Это-

Таблица 4.2. Получение клеточных экстрактов

1. Получите клеточную суспензию стандартными методами и трижды промойте клетки переосаждением в 0,9%-ном растворе NaCl (pH 7.1), содержащем $6,6 \cdot 10^{-4}$ М ЭДТА
2. Ресуспендируйте промытые клетки в солевом растворе с ЭДТА до концентрации $2-5 \cdot 10^7$ клеток/мл
3. Разрушите клетки тремя циклами замораживания и оттаивания в жидком азоте или в смеси сухого льда с этанолом. Можно также разрушить клетки ультразвуком или смешиванием с равным объемом октилового спирта (при 4 °С в течение ночи)
4. Разлейте гомогенат по пробиркам Эппендорфа, осветлите центрифугированием на микроцентрифуге в течение 1—2 мин и храните при -70 °С для последующего анализа

Таблица 4.3. Буферные растворы для электрофореза

Трис-цитратный буфер (ТЦ)	Рабочий раствор
Трис	17 г
Лимонная кислота (моногидрат)	9,1 г
Дистиллированная вода	1000 мл
pH	7,1
Трис-ЭДТА-боратный буфер (ТЭБ)	5-кратный концентрат
Трис	109,0 г
ЭДТА- Na_2	7,6 г
Борная кислота	6,2 г
Дистиллированная вода	1000 мл
pH	8,6
Буфер для геля: 50 мл однократного концентрированного буфера + 450 мл H_2O	
Буфер для камер: однократный концентрированный буфер	

Таблица 4.4. Процедуры для выявления ЛД, ГФД и НФ¹⁾

Ферментная система	Электродный буфер	Буфер геля	Окрашивающий раствор ²⁾
ЛД	ТЦ	ТЦ (0,1X)	H ₂ O (10 мл) 0,5 М трис pH 7,5 (5 мл) 1,0 М лактат натрия (5 мл) NAD ³⁾ (10 нг/мл) (5 мл) МТДТ ³⁾ (5 мг) ФМС ³⁾ (2 мг)
ГФД	ТЭВ'	ТЭБ (0,1X)	H ₂ O (5 мл) 0,5 М трис pH 7,5 (5 мл) 0,025 М глюкозо-6-фосфат (5 мл) 0,1 М MgCl ₂ ·6H ₂ O (5 мл) 0,005 М NADP ³⁾ (5 мл) МТДТ ³⁾ (5 мг) ФМС ³⁾ (2 мг)
НФ	ТЭБ	ТЭБ (0,2X)	H ₂ O (20 мл) 0,1 М NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (5 мл) Инозин (50 мл) Ксантиноксидаза ⁴⁾ (100 мкл) МТДТ ³⁾ (5 мг) ФМС ³⁾ (2 мг)

¹⁾ Во всех гелях разделение идет в течение 16—18 ч при 4°C и градиенте напряжения 4—5 В/см (160—180 В), NADP (5 мл в концентрации 0,005 М) добавляется к катодному буферу и к окрашивающему раствору при анализе ГФД.

²⁾ Эти концентрированные растворы смешиваются непосредственно перед использованием с равным объемом (25 мл) 2%-ной водной суспензии агара, после чего смесь разжижается и охлаждается до 45—50°C.

³⁾ NAD — никотинамиддинуклеотид; NADP — NAD-фосфат; МТДТ — диметилтиазолдифенилтетразолий; ФМС — феназинметосульфат.

⁴⁾ Концентрация 100 мг/мл; добавлять непосредственно перед смешиванием с агаром.

го можно достигнуть, используя кипящую водяную баню, горячую мешалку и вакуумный или микроволновый нагревательный шкаф. Перемешивание должно быть постоянным, чтобы избежать образования комков и пригорания.

II. Поместите в вакуум на 60 с для удаления пузырьков воздуха и медленно и равномерно охладите до 60°C при слабом помешивании.

III. Для систем ЛД и ГФД добавьте на этом этапе NADP и осторожно, но тщательно перемешайте.

IV. Перенесите крахмал в форму для геля, руководствуясь инструкциями изготовителей, и дайте остыть в течение 2—3 ч при комнатной температуре, избегая толчков. В лаборатории автора используется аппарат Бачлера для вертикального электрофореза в геле (Buchler Instruments Inc., Fort Lee, New Jersey).

Рекомендуется следующий порядок проведения электрофореза:

- I. Разморозьте экстракт клеток и центрифугируйте на микроцентрифуге в течение 1—2 мин.
- II. Осторожно удалите гребенку с 10 ячейками из формы для геля, руководствуясь инструкциями изготовителей, и добавьте в каждую ячейку 0,03—0,04 мл экстракта, используя тонко оттянутую пастеровскую пипетку или шприц с

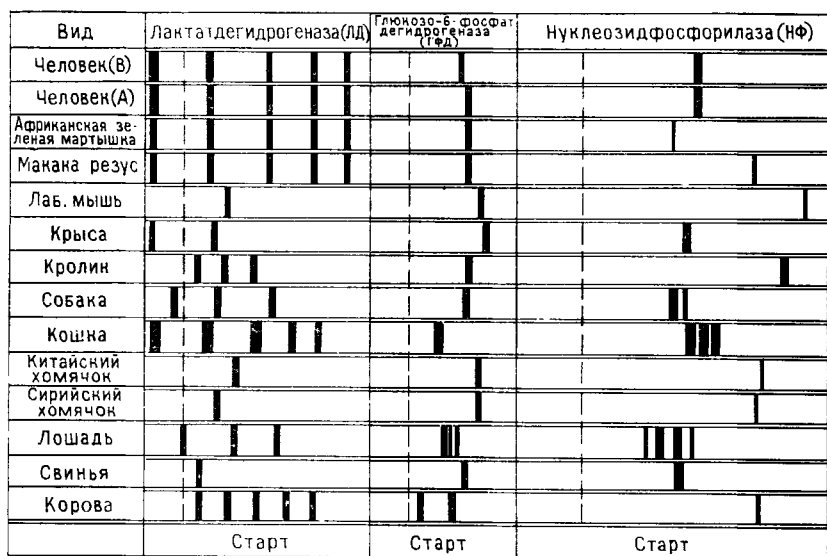


Рис. 4.4. Зимограммы изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛД), глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (ГФД) и нуклеозидфосфорилазы (НФ), показывающие типичное расположение полос в препаратах лний клеток наиболее часто используемых видов.

иглой калибра 26. Не допускайте попадания избытка экстракта в соседние ячейки.

- III. Покройте всю поверхность геля, обнажившуюся при удалении гребенки, нагретым керосином.
- IV. Добавьте буфер в электродные камеры и установите форму для геля на место с помощью удерживающей пружины (см. описание прибора).
- V. Приложите матерчатые тампоны, установите прибор в помещении при 4°C и начните разделение, используя градиент напряжения на пластине геля 4—5 В/см.

Рекомендуется следующий порядок обнаружения изоферментов:

- I. Выньте пластинку геля из формы, удалите по 5 см с обоих концов и разрежьте гель горизонтально на три иден-

тичные части, используя специальное приспособление для разрезания геля (см. описание фирмы-изготовителя).

II. Разделите три слоя и уложите в ванночки для окрашивания.

III. Покройте всю поверхность геля смесью агара с соответствующим красителем и инкубируйте при 37°C в темноте. Полосы начнут появляться через 1—3 ч в зависимости от типа фермента и активности экстракта.

Зимограммы, представленные на рис. 4.4, иллюстрируют типичную картину разделения изоферментов в обычно используемых линиях клеток от различных видов млекопитающих. Для более подробной информации обратитесь к обзору [11].

4.1.3. Цитогенетика

Кариологическая техника давно уже получила признание в качестве информативного теста на загрязнение линий клеток клетками других видов. Во многих случаях хромосомные наборы так резко различаются, что достаточно даже беглого микроскопического наблюдения. В других случаях, как, например, при сравнении линий клеток близкородственных приматов, требуется тщательный анализ хромосом, дифференциально окрашенных на G-сегменты ([10]; см. также разд. 4.3.3).

Таблица 4.5. Концентрированные растворы для обычного кариологического анализа

Коллемеид	— 1 мг на 50 мл БВ; хранить замороженным в небольших ампулах
KCl	— 0,075 М в БВ
Фиксатор	— 3 части безводного метанола 1 часть ледяной уксусной кислоты (объединять перед использованием)
Краситель	ацетоорцеин — 2 г орцеина растворяются в 100 мл 45%-ной уксусной кислоты
Краситель Гимза	— 10%-ный раствор в 0,01 М фосфатном буфере pH 7 (коммерческий препарат)

Ниже приводится метод приготовления цитогенетических препаратов. Для этого клетки, остановленные в метафазе, обрабатывают гипотоническим солевым раствором; набухшие клетки помещают на предметное стекло, после чего распластавшиеся клетки окрашивают и микроскопируют (табл. 4.5).

Рекомендуется следующий порядок подготовки клеток для кариологического анализа:

I. В клетки (например, во флаконах Т-75) на логарифмической фазе роста добавить коллемеид до конечной концентрации 0,1—0,4 мкг/мл.

- II. Инкубировать 1—6 ч в зависимости от времени генерации изучаемой популяции клеток. Диплоидные клетки человека с относительно продолжительным временем генерации требуют более длительной инкубации с коллемеидом, чем линия быстро пролиферирующих клеток яичника китайского хомячка.
- III. Осторожно слейте среду и обработайте клеточный монослой трипсином, как при стандартном пересеве. При работе с суспензионной культурой этот этап опускается. Суспензию открепившихся клеток перенесите в центрифужную пробирку объемом 15 мл. Добавьте сыворотку до конечной концентрации $\sim 10\%$ для остановки дальнейшего действия трипсина на клетки.
- IV. Осадите клетки центрифугированием, отбросьте супернатант и ресуспендируйте осадок в гипотоническом растворе KCl при 37°C .
- V. После 10—15 мин инкубации при 37°C соберите клетки центрифугированием при 100 g в течение 10 мин и отбросьте супернатант, ресуспендируйте клетки в небольшом объеме (примерно 1—2 объема клеточного осадка) гипотонического раствора KCl.
- VI. Медленно добавьте 5 мл свежеприготовленного фиксатора при постоянном перемешивании (пипетированием, встряхиванием или с помощью вортекса).
- VII. Через 20 мин или более осадите клетки центрифугированием, отбросьте супернатант и ресуспендируйте клетки в 5 мл свежего фиксатора. Дайте суспензии постоять при комнатной температуре в течение 10—15 мин.
- VIII. Повторите этап (VII), осадите клетки центрифугированием при 100 g в течение 2 мин, отбросьте супернатант и ресуспендируйте клетки в небольшом объеме (примерно 10—15 объемов клеточного осадка) свежего фиксатора.
- IX. Для приготовления препаратов нанесите суспензию по каплям на чистое, холодное (4°C) предметное стекло, наклоненное под углом 45° ; слегка покачивая стекло, дайте суспензии растечься по поверхности и высушите на воздухе при комнатной температуре.
- X. Обследуйте препарат в фазово-контрастном микроскопе. Метафазные пластинки должны быть равномерно и без перекрывания распределены по поверхности стекла. Плотность клеток на стекле можно регулировать, меняя число капель суспензии или изменяя концентрацию клеток в суспензии.
- XI. Теперь можно окрасить препарат либо ацетоорсеином в течение 3—5 мин, либо по Гимза в течение 10—15 мин; ополосните водопроводной водой и высушите на воздухе.

При желании можно заключить клетки в Пермаунт под покровное стекло.

Частота артефактов при использовании этого метода зависит от линии исследуемых клеток, а также от опыта экспериментатора. В процессе подготовки препаратов может, например, происходить разрушение клеток, сопровождающееся потерей или приобретением хромосом. Однако при подсчете хромосом на 50—100 метафазных пластинках и определении модального числа хромосом цитогенетик получит правдоподобную оценку истинного значения для данной линии клеток. Характерные значения для сотен клеточных линий приведены в каталоге видов II ATCC [8].

Для построения кариотипа изображения хромосом следует вырезать из микрофотографии и расположить их в соответствии с длиной плеч, положением центромер, присутствием вторичных перетяжек и т. д. Полученный кариотип можно сопоставить с данными атласа хромосом млекопитающих [12], включающего кариотипы более 550 видов млекопитающих. Для более точного кариотипического анализа требуется применение метода окраски на G-сегменты (см. разд. 4.3.3).

4.2. Тесты на микробное заражение

Приведенных ниже тестов достаточно для выявления большинства микроорганизмов, которые могут выживать в качестве примесей в линиях клеток и в культуральной среде. Методы выявления простейших здесь не представлены, поскольку эти организмы редко встречаются в перевиваемых линиях клеток. Описание этих методик можно найти в другом руководстве [13].

Коммерческая сухая среда наиболее пригодна для выявления бактерий грибов и микоплазмы при условии, что каждая партия среды заранее проверяется на загрязнение.

4.2.1. Обнаружение бактерий и грибов

Рекомендуется следующий порядок исследования клеточных культур и подозреваемой культуральной среды на загрязнение бактериями и грибами:

- I. Проведите индивидуальное исследование культуральных сосудов с помощью инвертированного микроскопа, по возможности с фазово-контрастной оптикой. Проверка должна быть особенно тщательной, когда предполагается культивирование большого количества клеток. Первоначально каждая культура просматривается при малом увеличении.
- II. В асептических условиях отберите порции проверяемых культур и оставьте культуры в изолированных условиях для дальнейшего анализа. В случае обнаружения микроб-

ных загрязнений проавтоклавируйте культуры и уничтожьте их.

III. Приготовьте влажное предметное стекло, используя капли исследуемой жидкости, и просмотрите в микроскопе при большом увеличении.

IV. Приготовьте мазки, зафиксируйте их нагреванием и окрасьте каким-либо стандартным методом (например,

Таблица 4.6. Предлагаемые режимы для обнаружения бактериальных и грибковых загрязнений в культурах клеток¹⁾

Испытательная среда	Температура, °C	Снабжение кислородом	Продолжительность наблюдения, сут
Кровяной агар со свежей дефибрированной кровью кролика (5%)	37	Аэробное	14
	37	Анаэробное	
	37	Аэробное	14
	26		
Триптиказный соевый бульон	37	Аэробное	14
	26		
Бульон с экстрактами мозга и сердца	37	Аэробное	14
	26		
Бульон Саборада	37	Аэробное	21
	26		
Бульон УМ	37	Аэробное	21
	26		
Питательный бульон с 2%-ным дрожжевым экстрактом	37	Аэробное	21
	26		

¹⁾ Более подробно см. руководство [15].

красителем Райта). Проанализируйте препараты под микроскопом с масляной иммерсией.

V. Сопоставьте полученные результаты с микрофотографиями руководств [14 и 15], в которых детально представлены наиболее распространенные микробные загрязнения.

Микроскопическое обследование пригодно лишь для обнаружения сильных загрязнений, но даже и они не всегда выявляются при простом микроскопическом анализе. Поэтому, чтобы убедиться, что хранящиеся клетки и среда не содержат грибов и бактерий, следует провести серию культуральных испытаний. Испытание запасов замороженных клеток рекомендуется проводить следующим образом.

I. Соберите и смешайте содержимое примерно 5% всех ампул данной партии, используя шприц с иглой калибра 20. Как правило, рекомендуется не добавлять антибиотики в среду, предназначенную для культивирования и сохранения популяции клеток запаса. Если же в среде были антибиотики, то размороженную суспензию следует центри-

фугировать при 2000 g в течение 20 мин и полученный осадок ресуспендировать в среде без антибиотиков. Серия таких переосаждений в среде без антибиотиков снизит концентрацию антибиотиков, присутствие которых в ряде случаев может мешать выявлению заражений.

- II. Отобранный материал посейте на каждую из испытательных сред, представленных в табл. 4.6 (как минимум по 0,3 мл клеточной суспензии), и инкубируйте в соответствии с указанными в таблице условиями. Включите в проверку положительные и отрицательные контроли, содержащие достаточный диапазон бактерий и грибов, которые ожидается обнаружить. Рекомендуемая для испытания группа микроорганизмов включает в себя *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus salivarius*, *Escherichia coli*, *Bacteroides distasonis*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger* и *Candida albicans*.
- III. Выращивание проводите в течение 14—21 сут, как указано в табл. 4.6, прежде чем убедитесь, что результаты испытания отрицательны. На наличие загрязнений указывает образование колоний на твердой среде или помутнение жидкой среды в соответствующих условиях выращивания.

4.2.2. Обнаружение микоплазмы

Заражение культуры клеток микоплазмой создает значительно более сложные проблемы, чем заражение бактериями и грибами. Присутствие некоторых видов микоплазмы в культуре может быть обнаружено по вызываемым ими дегенеративным эффектам. Однако другие виды микоплазмы могут активно метаболизировать и пролиферировать в культуре, не вызывая каких-либо заметных морфологических изменений в линии клеток, которую они загрязняют. При этом, если в задачу исследователя входит изучение метаболизма клеток, свойств поверхностных рецепторов, взаимодействия вирусов с хозяином и тому подобное, присутствие микоплазмы в культуре может приводить к неточной или вовсе неправильной интерпретации результатов. В настоящее время существует 9 основных методов выявления микоплазмы [5, 6], из которых в АТСС постоянно применяются прямые культуральные испытания и непрямые исследования с использованием бисбензимидазольного флуорохрома (Хехст 33258) для окраски ДНК. Контролю на микоплазму подвергаются все приходящие в коллекцию линии клеток, а также все клетки, предназначенные для распределения [16].

Сыворотка, дрожжевой экстракт и другие компоненты, используемые для выделения и размножения микоплазмы, должны быть предварительно проверены на отсутствие токсичности и на активность, индуцирующую рост [5]. В качестве положи-

Таблица 4.7. Состав сред, используемых для культуральных испытаний на присутствие микоплазмы

А. Основная среда

Компонент	Концентрация, г/л	Компонент	Концентрация, г/л
D-Глюкоза	50	D-Пентотенат кальция	0,024
L-Аргинин-HCl	10	Пиридоксаль-HCl	0,020
ДНК тимуса	0,02	Фолиевая кислота	0,010
Холинхлорид	0,922	Цианокобаламин	0,003
i-Инозит	0,110	D-Биотин	0,002
Ниацинамид	0,024	Тиамин-HCl	0,010

Растворить в бидистиллированной воде, довести объем до 1 л, стерилизовать фильтрованием, довести в случае необходимости pH до 7,2—7,4; хранить порциями по 100 мл при —70°C

Б. Бульон для микоплазмы

Компонент	Инструкция
Сухой бульон (Becton Dickinson) 14,7 г	В 600 мл БВ и автоклави- ровать
Феноловый красный 0,02 г	
Лошадиная сыворотка 200 мл	Стерильно смешать с бульо- ном при комнатной темпе- ратуре
25%-ный дрожжевой экстракт 100 мл	Хранить при —20°C в алик- вотах по 100 мл 25%-ного раствора. Конечная концент- рация 2,5%
Основная среда А 100 мл	

Довести при необходимости pH до 7,2—7,4, разлить порции по 10 мл в стерильные пробирки, хранить при 4°C и использовать в течение 4 нед

В. Среда с агаром для микоплазмы

Компонент	Инструкция
Сухой агар 23,7 г	В 600 мл БВ и авто- клавируют. Охладить до 50°C в водяной бане
Лошадиная сыворотка 200 мл	Нагреть до 37°C и сте- рильно смешать с рас- плавленным агаром
25%-ный дрожжевой экстракт 100 мл	
Основная среда А 100 мл	

Быстро перенести порции по 10 мл в чашки Петри диаметром 60 мм и хра-
нить в закрытом контейнере при 4°C. Использовать в течение 4 нед

тельных контролей используются штаммы *M.arginini*, *M.ogale* и *A.laidlawii*, поскольку они относятся к видам, наиболее часто выделяемым из культивируемых клеток [6, 16].

- I. При проверке культуры следует быть уверенным в том, что культуральная среда не содержит антибиотиков, особенно гентамицина, тилоцина и других ингибиторов микоплазмы.
- II. Из культуры, достигшей стадии полного или плотного монослоя и не получавшей питательных добавок в течение по крайней мере 3 сут, удалите всю среду, за исключением 3 мл, раббером соскребите часть клеток. Из суспен-

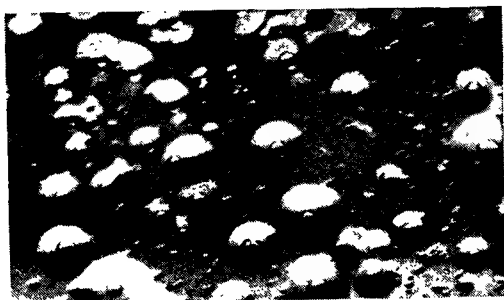


Рис. 4.5. Микрофотография колонии микоплазмы на агаровой пластинке. Мелкие частицы между колониями — это обломки клеток из клеточной суспензии.

зионных культур, приближающихся к стационарной фазе, пробы можно отбирать непосредственно.

- III. Перенесите 1 мл клеточной суспензии в пробирку с бульоном для микоплазмы и 0,1 мл суспензии на пластинку с агаром для микоплазмы.
- IV. Инкубируйте бульон в анаэробных условиях при 37°C, а пластинки агара при той же температуре во влажной газовой смеси 95% N₂ и 5% CO₂. Изменение pH бульона или его помутнение будет свидетельствовать о наличии микоплазмы.
- V. В течение последующих 14 сут переносите по 0,1 мл бульона на свежую агаровую пластинку с недельным интервалом и инкубируйте при 37°C в анаэробных условиях.
- VI. Используя инвертированный микроскоп, обследуйте все агаровые пластинки (увеличение 100X и 300X) еженедельно, в течение как минимум 3 нед. На рис. 4.5 представлена микрофотография колоний микоплазмы на агаре.

Поскольку некоторые штаммы микоплазмы, особенно *M. hyoghinis*, трудно или невозможно выращивать в искусственной

Таблица 4.8. Растворы для непрямого флуорохромного выявления микоплазмы

Концентрированный раствор флуорохрома (1000×)

Краситель Хехст 33258 5 мг
 Тимерсаль (мертиолат) 10 мг
 Добавьте в 100 мл раствора Хэнкса без бикарбоната натрия и фенолового красного и тщательно перемешайте в течение 30 мин при комнатной температуре.
 Храните при 4 °С в темной посуде, тщательно обернутой алюминиевой фольгой. Краситель чувствителен к свету и теплу.

Рабочий исходный раствор флуорохрома (1–5×)

Готовится путем добавления 0,1–0,5 мл концентрированного раствора (1000×) в 100 мл раствора Хэнкса без бикарбоната и фенолового красного и перемешивается, как и при приготовлении раствора (1000×).

Среда для заключения

Лимонная кислота (0,1 М)	22,2 мл
Na ₂ HPO ₄ (0,2 М)	27,8 мл
Глицерин	50 мл

Хранить при 4 °С и проверять pH перед использованием. Оптимальный pH для флуоресценции составляет 5,5.

Фиксатор

Ледяная уксусная кислота	1 часть
Безводный метанол	3 части

среде, в программу контроля должен быть также включен не-прямой метод исследования. Непрямое обнаружение микоплаз-мы проводится в следующей последовательности.

- I. В чашки Петри (60 мм), содержащие покровные стекла (№ 1) размером 10,5×22 мм, внесите 10⁵ индикаторных клеток в 4 мл МЕМ с 10% эмбриональной телячей сыво-ротки. Обычно используются клетки Vero или клетки 3T6. Эти клетки помогают усиливать низкий уровень инфек-ции, которая в противном случае может остаться незаме-ченной.
- II. После инкубации этих индикаторных культур в течение 16–24 ч при 37 °С в атмосфере 95% воздуха и 5% CO₂ добавьте 0,5 мл исследуемых клеток, готовя суспензию так же, как и в прямом испытании.
- III. Вновь поместите чашки в термостат на 6 сут.
- IV. Извлеките культуральные чашки из термостата, слейте среду и немедленно добавьте фиксатор. Важно не дать культуре высохнуть перед добавлением фиксатора, по-скольку это может привести к артефактам.
- V. Через 5 мин замените «использованный» фиксатор на свежий так, чтобы стекла с клетками все время остава-лись погруженными в раствор.

- VI. Отсосите фиксатор, высушите препараты на воздухе и приготовьте свежий рабочий раствор из 1000-кратного концентрата.
 - VII. Добавьте по 5 мл окрашивающего раствора в каждую чашку, закройте и оставьте на 30 мин при комнатной температуре.
 - VIII. Отсосите краситель и промойте культуру тремя сменами дистиллированной воды (по 3—5 мл). После последней промывки тщательно отсосите воду и дайте препаратам высохнуть.
 - IX. Смонтируйте покровные стекла на предметных стеклах (1×3 см) клетками вверх, используя каплю среды для заключения.
 - X. Добавьте вторую каплю среды для заключения на поверхность смонтированного препарата и покройте покровным стеклом большего размера, соблюдая стандартную технику заключения для избежания захвата пузырьков.
 - XI. Исследуйте препараты в флуоресцентном микроскопе при увеличении 500×, используя возбуждающий фильтр BG12 (330/380 нм) и запирающий фильтр № 50 (LP440 нм).
- Примечание.* Клетки, достигшие монослоя, недостаточно распластаны и окрашиваются Хехстом 33258 не очень хорошо. Следите, чтобы для окраски использовались культуры клеток, не достигшие полного монослоя.

В каждую серию испытаний необходимо включать положительные и отрицательные контроли. Отрицательным контролем для этого непрямого испытания могут служить клетки Vero или 3T6, инкубируемые только со средой. Положительными контролями могут служить *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. orale* и *A. laidlawii*, причем если есть возможность выбора, то следует использовать штаммы, приведенные в начале списка. Нуклеиновые кислоты микроорганизмов выявляются в виде точечного или фибриллярного материала, рассеянного по цитоплазме и сконцентрированного в ядрах культивируемых клеток (рис. 4.6). При тяжелых инфекциях прокрашивается также и внеклеточное пространство.

Получение положительных контролей, то есть искусственное заражение культур, создает опасность для других линий клеток, так что заражение культур по срокам и месту проведения должно быть отделено от работы с другими линиями клеток. Положительные контроли следует фиксировать и хранить при —4 °С в эксикаторе вплоть до проведения анализа.

Все работы по качественному выявлению микоплазмы в неизвестных культурах следует проводить в вертикальных ламинарных боксах, по возможности освобожденных от работы с другими культурами. Нужно постоянно помнить о возможности зара-

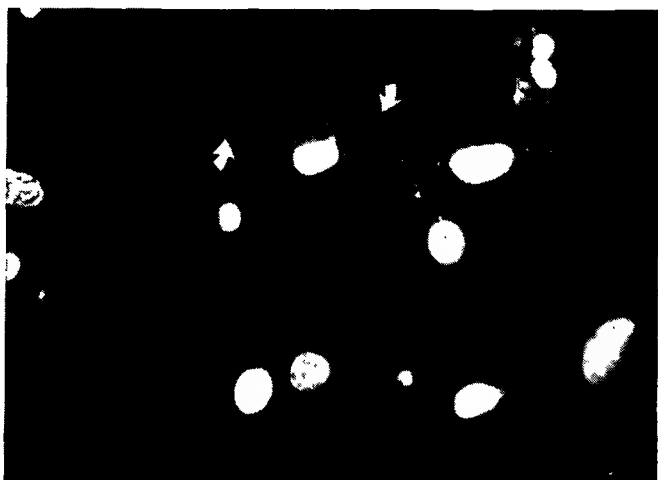


Рис. 4.6. Микрофотография ДНК микоплазмы (стрелки), окрашенной красителем Хехст. Более крупные флуоресцирующие тела — это ядра клеток Vero, использованных в качестве индикаторных. (Фотография любезно предоставлена М. Л. Мэси).

жения чистых культур аэрозолями от зараженных микоплазмой культур при работе с ними в одном и том же боксе или через руки исследователя в ходе работы с многочисленными культуральными сосудами. В связи с этим рекомендуется дезинфекция бокса или рабочего места.

Более подробная информация о работе с микоплазмой приведена в руководствах [5, 6 и 16].

4.2.3. Тесты на присутствие вирусов

Среди различных тестов, применяемых для выявления посторонних агентов, ассоциированных с клетками, наиболее трудными являются тесты на эндогенные и экзогенные вирусы. Развитие характерного цитопатогенного эффекта (ЦПЭ), со всей очевидностью, может служить ранним указанием на присутствие вируса. Однако отсутствие ЦПЭ не может служить доказательством отсутствия вируса в культуре. Действительно, латентная инфекция может существовать в линиях клеток, не проявляя себя, пока не будут применены подходящие иммунологические, цитологические, ультраструктурные и/или биохимические тесты. Для активации и выделения вируса могут потребоваться дополнительные системы хозяев или специфическая обработка (например, галогенизированными нуклеозидами).

С самого начала следует подчеркнуть, что представленные ниже прописи следует рассматривать как средства быстрого выявления наиболее часто встречающихся вирусных заражений клеточных линий. В эти прописи помимо рутинного анализа на ЦПЭ в фазово-контрастном микроскопе включены инъекции в яйца и некоторые тесты на совместное культивирование и гем-адсорбцию. Аналогичные общие тесты рекомендуются правительственными службами в случае использования линий клеток — продуцентов биологического продукта.

Для морфологического выявления вирусов в культуре.

- I. Расположите каждый флакон или сосуд таким образом, чтобы свет проходил через монослой, и попытайтесь обнаружить бляшки, фокусы или участки нарушения однородности монослоя. При посеве культур из банка замороженных клеток следует объединять содержимое не менее 5% ампул из каждого набора клеток.
- II. С помощью инвертированного микроскопа и используя по возможности фазово-контрастную оптику, обследуйте каждый культуральный сосуд, обращая особое внимание на наличие измененных участков, описанных выше, отличающихся по морфологии от окружающих клеток.
- III. При необходимости проведения дополнительных исследований или для анализа при большем увеличении приготовьте культуры на покровных стеклах. Покровные стекла с полученными монослойными культурами следует фиксировать и окрашивать с помощью стандартных гистологических методов, а морфологию исследуемых клеток следует сравнивать с соответствующими контролями.

Присутствие некоторых вирусов, не вызывающих ЦПЭ в культивируемых клетках, может быть установлено с помощью теста на гемадсорбцию. Зараженные клетки адсорбируют индикаторные эритроциты при кратковременной инкубации на холоду. Для проведения этого теста следует:

- I. Получить культуры исследуемых клеток во флаконах Т-25, используя такую плотность посева, чтобы клетки достигли монослоя в течение 48—72 ч культивирования. При анализе культур из банка замороженных клеток следует объединять для посева не менее 5% ампул из каждой партии клеток.
- II. Слить среду с клеток и ополоснуть их 5 мл раствора Хэнка без двухвалентных катионов.
- III. Добавить к клеткам по 0,5 мл 0,5%-ной свежеприготовленной суспензии эритроцитов кур, морских свинок и человека (группа крови 0) (эритроциты трижды промыть физиологическим раствором). Флаконы с клетками и эритроцитами инкубировать при 4 °С в течение 20 мин.

IV. Провести макроскопический и микроскопический (при небольшом увеличении) анализы агрегации эритроцитов и их адсорбции на монослое.

V. Прежде чем сделать вывод об отсутствии гемадсорбции, следует повторить тест со всеми культурами, на которых были получены отрицательные результаты.

В качестве удобного положительного контроля можно использовать культуру клеток RhМК, зараженных 0,2 мл неразведенного препарата вируса гриппа за 48—72 ч до проведения теста.

Инъектирование проверяемых клеток или их гомогенатов в куриные яйца с развивающимся зародышем является дополнительным чувствительным тестом на присутствие вирусов. Подготовку яиц для этого теста следует производить следующим образом:

- I. Просверлите небольшое отверстие в скорлупе над воздушным мешком (тупой конец) у 8—9-суточных куриных эмбрионов, используя электродрель и сверло диаметром 1,6 мм. При этой и всех последующих операциях следует использовать простерилизованные инструменты. Перед и после каждой манипуляции протирайте поверхность скорлупы, где проводится сверление, тампоном, смоченным 70%-ным спиртом. Сверла перед использованием также должны быть помещены в 70%-ный этанол.
- II. Используя лампу для просвечивания яиц, найдите участок с наиболее выраженным развитием кровеносных сосудов зародыша и аккуратно просверлите скорлупу в центре этого участка, не повреждая ее оболочки.
- III. Нанесите 2—3 капли раствора Хэнкса на боковое отверстие и осторожно продавите этот раствор через оболочку скорлупы, используя иглу от шприца с калибром 26. Раствор Хэнкса должен просочиться и распространиться над хорионаллантоисной мембраной (ХМ) для облегчения ее отделения от оболочки.
- IV. Прижмите короткую резиновую трубку к отверстию на тупом конце яйца и слегка отсосите ртом воздух. С помощью лампы для просвечивания яиц следите за образованием искусственного воздушного мешка над ХМ.
- V. Заклейте оба отверстия квадратиками липкой ленты и проинкубируйте яйца при 37 °С в горизонтальном положении. Для инкубации яиц можно пользоваться стандартными термостатами для клеточных культур и термостатированными комнатами. Термостаты с высокой влажностью или с продувкой смеси воздуха с CO_2 для этой цели не подходят.

Яйца с развивающимся зародышем и с искусственным воздушным мешком готовы для проверки клеток на вирусное за-

ражение через 24—48 ч. Очень важно перед инъекцией клеток проверить все яйца и отбросить те из них, в которых обнаружатся признаки гибели или дегенерации. Присутствие интактных кровеносных сосудов и движения зародыша могут, как правило, служить указанием на хорошее состояние яиц. В этом случае следует приступить к следующим процедурам:

- I. Приготовьте суспензию проверяемых клеток в подходящей культуральной среде в концентрации $2,5\text{--}5 \cdot 10^7$ клеток/мл. Опухолевые клетки заморозьте в смеси сухого льда со спиртом и разморозьте в водяной бане при 37°C . Эту операцию проведите 2 раза.
- II. Удалите наклейку с бокового отверстия яйца и введите по 0,2 мл суспензии или гомогената клеток на ХМ каждого из 5—10 яиц.
- III. Через сутки после инокуляции клеток просмотрите все яйца с помощью просвечивающей лампы и отбросьте яйца с погибшими зародышами. Периодически повторяйте осмотр в течение 8—9 сут.
- IV. Если эмбрион сохранил жизнеспособность к концу периода инкубации, вскройте яйцо над искусственным воздушным мешком и тщательно обследуйте ХМ для выявления отеков, участков изменения морфологии и оспинок. Обследуйте также и сами зародыши для выявления таких аномалий, как искривление тела или задержка роста.
- V. В случаях, указывающих на наличие вирусного заражения, повторите тест, используя как повторные образцы подозреваемых клеток, так и свежие порции жидкости из яиц, в которых зародыш погиб либо развился неправильно.

Положительные контроли могут быть получены путем инъекции в яйца вируса гриппа, вируса болезни скота Ньюкастла и/или вируса саркомы Рауса. Для отрицательного контроля в яйца вводится только стандартная среда для культуры клеток. В работе [17] приведены схемы и более детальное описание введения материала в яйца.

Другим удобным методом обнаружения вирусного загрязнения является совместное культивирование испытуемых клеток и линий клеток, служащих и хорошими хозяевами для предполагаемых вирусов. Этот метод особенно удобен для суспензионных культур. Выбор индикаторной линии или линии клеток-мишеней зависит от вида, к которому принадлежит испытываемая линия клеток. Так, например, при проверке линий клеток человека можно использовать для совместного культивирования клетки WI-38, клетки MRC-5 или первичную культуру эмбриональных клеток почки человека. В данном случае в качестве индикаторной линии можно использовать клетки другого вида, например африканской зеленой мартышки.

После выбора подходящей линии индикаторных клеток предлагается следующая методика проведения совместного культивирования.

- I. Посейте во флаконы Т-75 по 10^6 клеток каждой линии в общем объеме 8 мл соответствующей ростовой среды. В ряде случаев концентрации клеток могут варьировать для поддержания обеих клеточных популяций в ходе совместного культивирования. Так, например, при совместном культивировании очень быстро пролиферирующих индикаторных клеток с испытуемыми, размножающимися медленнее, начальное число первых и последних при посеве может быть доведено до соотношения 1 : 10. С другой стороны, медленно размножающаяся популяция может быть повторно посеяна во флакон со смешанной культурой клеток в случае преимущественного зарастания культуры клетками, делящимися быстрее.
- II. Меняйте культуральную среду дважды в неделю и проводите пересев клеток, как обычно, через некоторое время после достижения полного монослоя. При анализе линий, растущих в суспензии, собирайте клетки центрифугированием и продолжайте их культивирование после обычного разбавления.
- III. Периодически проверяйте культуры на ЦПЭ и проводите тест на гемадсорбцию. Эти испытания проводите не реже чем каждые 2—3 нед, в соответствии с изложенными выше методиками.

Присутствие вируса может быть обнаружено методами стандартной нейтрализации (подавление гемадсорбции, бляшкообразования, гемагглютинации) либо с помощью реакции связывания комплемента.

Следует подчеркнуть, что предложенный скрининг может не выявить латентные вирусы и вирусы, не вызывающие общий ЦПЭ и не индуцирующие гемадсорбцию. В работах [17, 18] более подробно изложены методы выявления вирусного заражения, а также приведены дополнительные специализированные тесты для обнаружения вирусов, заражающих клетки.

4.3. Тесты на заражение клеточных культур клетками другого вида

По мере увеличения количества используемых клеточных линий пропорционально возрастает и риск загрязнения этих линий клетками других линий. Проблема становится особенно острой в лабораториях, в которых проводятся интенсивные исследования со многими различными линиями клеток человека (гибридомами), доступными к настоящему времени. Тесты на полиморфные изоферменты, маркерные поверхностные антиге-

ны, а также кариологический анализ являются важными инструментами в обнаружении клеточных перекрестных загрязнений внутри данного вида.

4.3.1. Изоэнзимология

В разд. 4.1.2 был приведен метод подтверждения видовой принадлежности линии клеток по электрофоретической подвижности изоферментов ГФД, ЛДГ и НФ. Сходная методика может быть также использована для скрининга межвидовых заражений.

В линиях клеток от различных особей одного и того же вида часто встречаются различные ко-доминантные аллели данного ферментативного локуса, продукты которого полиморфны и разделяются электрофоретически. В большинстве случаев фенотип этих аллельных изозимов (аллоферментов) чрезвычайно стабилен. В соответствии с этим если определить фенотипы аллоферментов для достаточного числа локусов, то они могут стать генетической аллоферментной «визитной карточкой» для каждой изучаемой специфической линии клеток [19—24].

При работе с линиями клеток человека определение фенотипов аллоферментов семи или более ферментов, таких как аденозиндезаминаза (АДА), ГФД, эстераза D (ЭС-D), пептидаза D (ПЕП-D), фосфоглюкомутазы 1 и 3 (ФГМ₁, ФГМ₃) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (ФГД), оказывается достаточным для весьма надежной идентификации клеток [20]. Методология анализа приведена в разд. 4.1.2, а в табл. 4.9 приведены прописи соответствующих красителей.

Примеры зимограмм для шести таких аллоферментов из линий клеток человека приведены на рис. 4.7. В случае АДА для простоты приведены только эритроцитарные формы. В клетках человека из некоторых других тканей обнаруживаются дополнительные АДА. Они могут представлять собой вторичные формы изоферментов АДА, образующиеся из изозимов АДА эритроцитарного типа путем посттрансляционной модификации. Более того, экспрессия изоферментов АДА может зависеть также и от условий культивирования [23].

Аллоферменты ФГМ₃ относятся к наиболее быстромигрирующим формам этой группы. Эти аллоферменты обладают низкой активностью и в соответствии с этим требуют более длительной окраски. Аллоферменты ФГМ₁ мигрируют медленно, обладают высокой активностью и быстро окрашиваются. Аллоферменты лучше всего выявляются на ранних стадиях до более полного выявления ФГМ₂ и ФГМ₃.

Частота встречаемости генетической структуры для каждой отдельной линии клеток может быть оценена по наблюдаемому фенотипу аллоферментов и результатам оценки частоты)

Таблица 4.9. Процедуры¹⁾ для выявления АДА, ЭС-D, ПЕП-D, двух видов ФГМ и ФГД

Фермент	Буфер в камере	Буфер в геле	Раствор красителя
АДА	ТЦ	ТЦ (0,1×)	0,1 М Na ₃ PO ₄ pH 7,0 (20 мл) H ₂ O (30 мл) Аденозин (50 мг) 10 мг МТДТ ФМС (3 мг) Нуклеозидфосфорилаза (1 мг/мл) (50 мкл)
ПЕП-D	ТЭБ	ТЭБ (0,1×)	Ксантиноксидаза (10 мг/мл) (50 мкл) H ₂ O (40 мл) 0,1 М NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 (10 мл) L-Фенилаланил-L-пролин (20 мг) Пероксидаза хрена (тип 2) (10 мг) Оксидаза аминокислот (1 мг/мл) (50 мкл) О-Дианзидин (2 мг) 0,1 М MnCl ₂ (0,2 мл) (добавлять непосредственно перед смешиванием с наносимым на гель раствором)
ЭС-D	ТЦ	ТЦ (0,1×)	0,05 М ацетат натрия pH 5,2, (50 мл) Метилумбеллифериллацетат, растворенный в 2 мл ацетона (10 мг)
ФГМ ₁ и ФГМ ₃	ТЦ	ТЦ (0,1×)	H ₂ O (35 мл) 0,5 М трис pH 8,0 (15 мл) Глюкозо-1-фосфат с 1% глюкозо-1,6-дифосфат, (200 мг) MgCl ₂ (25 мг) ФМС (3 мг) МТДТ (10 мг) ГФД (100 ед/мл), (100 мкл)
ФГД	ТЭБ	ТЭБ (0,1×)	H ₂ O (35 мл) 0,5 М трис pH 7,0 (15 мл) 6-Фосфоглюконат натрия (200 мг) NADP (20 мг) ФМС (3 мг) МТДТ (10 мг)

¹⁾ Разделение во всех гелях проходит в течение 16—18 ч при 4 °С и градиенте напряжения 4—5 В/см (160—180 В), NADP (5 мл 0,005 М раствора) добавляется к катодному буферу и ко всем окрашивающим растворам во всех случаях, когда определяется NADP-дегидрогеназа. Более подробно о проведении анализа см. табл. 4.4 и относящийся к ней текст. Для всех ферментов, за исключением ЭС-D, окрашивающие растворы смешиваются непосредственно перед использованием с равным объемом 2%-ного агара в воде. Смесь нагревается для большей гомогеничности и перед нанесением охлаждается до 45—50 °С. При анализе ЭС-D на гель накладывается фильтровальная бумага, на которую и наносится окрашивающий раствор. В последнем случае положение аллозимов выявляется путем удаления фильтровальной бумаги после инкубации и просмотра геля под длинноволновым ультрафиолетовым светом. Полосы появляются в промежутке времени от 10 мин до 3 ч в зависимости от типа клеток и аллофермента, а также от количества использованных для гомогенизации клеток.

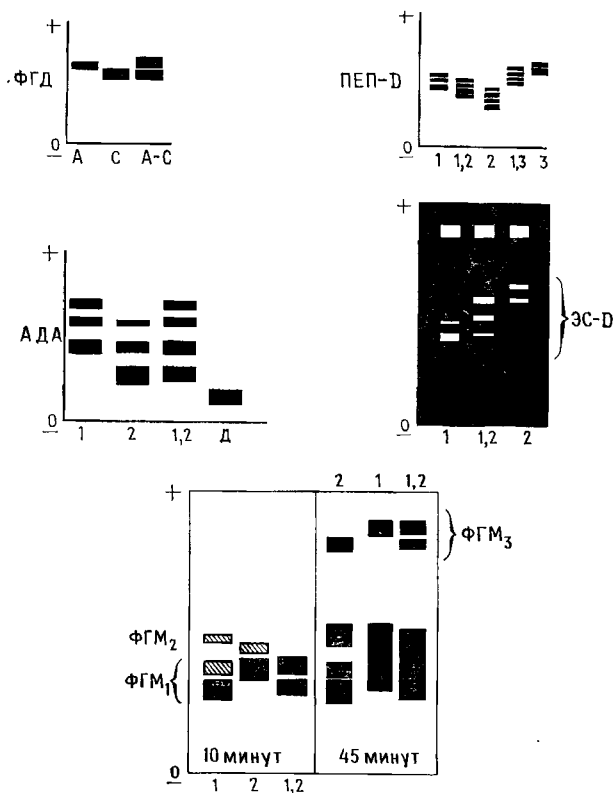


Рис. 4.7. Зимограммы, показывающие фенотипы шести полиморфных ферментов линий клеток человека. ФГД — 6-фосфоглюконатдегидрогеназа; ПЕП-D — пептидаза D; АДА — аденозиндезаминаза; ЭС-D — эстераза D; ФГМ_{1,3} — фосфоглюкомутазы 1 и 3. В каждом случае показано положение старта (0), а названия наиболее распространенных фенотипов приведены на оси абсцисс. В ряде случаев показаны множественные полосы аллоферментов, но иногда они мигрируют так близко, что сливаются, образуя единую, более широкую полосу. Зимограммы ФГМ приведены на одном и том же геле, но после различного времени инкубации, поскольку для выявления ФГМ₃ требуется большее время. Изофермент ФГМ₂ выявляется после промежуточного времени инкубации, что затрудняет анализ ФГМ₁.

фенотипов в популяции здоровых людей (табл. 4.10). Так, например, линия клеток с генетической структурой АДА-1, ГФД-В, ЭС-D-1, ФГМ₁-2, ФГМ₃-1 и ФГД-А, полученная от белого мужчины, будет характеризоваться частотой фенотипа $0,8845 \times 1,0 \times 0,8131 \times 0,9780 \times 0,0558 \times 0,5403 \times 0,9536 = 0,0202$. Полученное значение отражает вероятность встречи линии клеток с указанной выше генетической структурой и может оказаться информативным, если возникнет вопрос о взаимозагрязнении ли-

Способность этого метода различать клеточные линии увеличивается при определении электрофоретических профилей дополнительных аллозимов. К числу наиболее часто используемых для этой цели относятся кислая фосфатаза (КФ1), глиоксалаза 1 (ГО1), малатдегидрогеназа (МД), α -фукозидаза (α -Ф) и аденилаткиназа (АК1) [22, 24].

Таблица 4.10. Частота фенотипов семи полиморфных ферментов в популяциях белых и чернокожих людей¹⁾

Фермент	Фенотип	Частота фенотипа	
		Белые	Чернокожие
АДА	1	0,8845	0,9320
	1—2	0,1138	0,0668
	2	0,0017	0,0012
ГФД	A	0	0,4400
	B ²⁾	1	0,5600
ЭС-D	1	0,8131	0,8039
	1—2	0,1776	0,1961
	2	0,0092	0,0096
ПЕП-D	1	0,9780	0,9110
	1—2	0,0220	0,0479
	1—3	0,0000	0,0411
	2	0,0001	0,0006
	3	0,0000	0,0005
ФГМ ₁	1	0,5849	0,6019
	1—2	0,3565	0,3204
	2	0,0558	0,0485
ФГМ ₃	1	0,5403	0,1362
	1—2	0,3997	0,4085
	2	0,0600	0,4553
ФГД	A	0,9536	0,9264
	AC	0,0455	0,0727
	C	0,0009	0,0009

¹⁾ По данным работы [22].

²⁾ Данные только по мужчинам: маркер сцеплен с X-хромосомой.

Полиморфные изоферменты описаны также для линий мышечных клеток и для гибридов. Для выявления межвидового взаимозагрязнения в этих случаях можно использовать анализ аллоферментов эстеразы (ЭС-1 и ЭС-2), дипептидазы 1 (ДП-1), глутамат-оксалоацетат — трансаминазы 2 (ГОТ-2), изоцитратдегидрогеназы 1 (NADP-зависимая), малатдегидрогеназы (ADP-зависимая; цитозольная форма), глюкозофосфатизомеразы 1 (ГФИ-1) и фосфоглюкомутаз 1 и 2 (ФГМ₁ и ФГМ₂). И хотя методология электрофоретического разделения и этих аллоферментов достаточно разработана [25], частоты их распространения изучены недостаточно, чтобы служить маркерами специфических линий клеток мышц.

4.3.2. Тесты на антигены групп крови и антигены гистосовместимости

Антигены групп крови и лейкоцитарные антигены человека (ЛАЧ) на плазматических мембранах клеток человека в культуре могут служить дополнительными и часто используемыми маркерами для идентификации клеток. Отсутствие экспрессии или частичная экспрессия этих антигенов были достоверно показаны во многих случаях.

Антигены групп крови присутствуют на поверхности нормальных эпителиальных клеток человека в первичной культуре и на поверхности некоторых постоянных линий эпителиальных клеток. Обычный тест на эти антигены заключается в следующем.

- I. Получите суспензию клеток путем диссоциации клеток монослоя или отбора части суспензионной культуры. Промойте клетки ФСБ стандартным центрифугированием и ресуспендированием.
- II. Подсчитайте число клеток и доведите их концентрацию до $1-2 \cdot 10^6/\text{мл}$.
- III. Поместите 4 отдельные капли суспензии на большое предметное стекло и добавьте к трем каплям по капле антисыворотки групп крови человека А, В или АВ. К четвертой капле, служащей отрицательным контролем, добавьте каплю ФСБ.
- IV. Немедленно смешайте компоненты каждой капли с помощью разных стеклянных палочек и наблюдайте при малом увеличении наличие агглютинации. В отрицательном контроле также может происходить некоторое слипание клеток, но эта агрегация оказывается ничтожной по сравнению с таковой в смеси суспензии, содержащей антиген клеток с антисывороткой.

Опыт предложившей этот тест лаборатории показывает, что антиген группы крови донора может экспрессироваться даже в линиях опухолевых клеток [8, 9]. Часто случается, однако, что другие линии клеток человека, полученные от доноров с группами крови А, В или АВ, не взаимодействуют с антисыворотками, давая ложноотрицательные результаты, относящиеся клетки к группе крови О. Можно полагать, что это вызвано исчезновением антигенов с клеточной поверхности в ходе диссоциации клеток; это можно проверить, повторив тест после 2—18 ч культивирования клеток в суспензионной культуре. Однако, несмотря на то что такая инкубация должна была бы восполнить антигены группы крови на клеточной поверхности, клетки, дававшие ложноотрицательный ответ, оставались отрицательными по экспрессии антигенов групп крови.

Эта проблема с выявлением антигенов групп крови на поверхности культивируемых эпителиальных клеток ждет своего

решения. Тем не менее при первичном скрининге межвидового загрязнения линий клеток этот простой тест в сочетании с другими тестами обладает значительной информативностью.

В работах [8] и [9] приведены результаты использования этого теста при анализе различных линий клеток.

Главная система гистосовместимости у человека состоит из антигенов ЛАЧ, расположенных на плазматических мембранах большинства ядерных клеток. Эти многочисленные антигены, кодируемые кодоминантными генами (77 аллелей) пяти тесно сцепленных локусов в 6-й хромосоме, представляют собой наиболее полиморфную из известных систем у человека. Антигены выявляют с помощью стандартного двухэтапного цитотоксического теста, зависящего от комплемента; для оценки жизнеспособности используется тест на исключение красителя (разд. 3.3.1).

Ниже приведено упрощенное стандартное описание проведения теста.

- I. Антитела из выбранной панели внесите в лунки пластиковой пластинки для типирования гистосовместимости по 1 мкл на лунку, используя шприц Гамильтон. Коммерческие препараты антисывороток получают обычно от доноров, иммунизированных ЛАЧ при беременности, или в результате переливания крови. Пластинки для типирования, загруженные спектром антисыворотки к ЛАЧ, могут быть также предназначены для рутинных клинических исследований. Для каждой клеточной линии и для каждого проведения анализа должны иметься отрицательные контро-ли.
- II. Получите суспензию клеток и промойте их, как и в тесте на антигены групп крови, используя среду RPMI 1640 без сыворотки. Доведите концентрацию клеток до 10^8 /мл и добавьте по 1 мкл суспензии в каждую лунку, используя шприц Гамильтон.
- III. Смешайте содержимое лунок, установив пластинку на шейкер, и инкубируйте 30 мин при 20 °C.
- IV. Добавьте в каждую лунку по 5 мкл кроличьего комплемента и инкубируйте 60 мин при 20 °C.
- V. Добавьте в каждую лунку по 3 мкл 5%-ного водного раствора эозина и дайте окраситься погибшим клеткам в течение 2 мин.
- VI. Заполните лунки забуференным формалином (pH 7,2) и накройте покровными стеклами (50×75 мм) для выравнивания поверхности жидкости.
- VII. С помощью инвертированного микроскопа найдите окрашенные клетки. Как правило, достаточно лишь приблизительно оценить долю окрашенных клеток, а не производить точного подсчета.

Этот метод может быть с успехом применен для типирования ряда линий клеток, хотя в некоторых случаях может потребоваться модификация предложенной процедуры. Главным фактором, определяющим вариабельность процедуры, является присутствие неспецифических антител в препаратах кроличьего комплемента и в антисыворотке к ЛАЧ.

Сыворотка кролика является наиболее подходящим источником комплемента для этой реакции, благодаря присутствию в ней природных антител к клеткам человека. Взаимодействие этих антител с другими антигенами клеточной поверхности усиливает комплемент-зависимое цитотоксическое действие комплекса антител к ЛАЧ с антигенами. Титры и специфичность этих природных антител могут варьировать даже среди смешанных препаратов сыворотки кролика. Возникающие проблемы можно преодолеть, изменяя продолжительность инкубации, используя различные источники и разведения комплемента, разводя кроличью сыворотку сывороткой человека, или же путем абсорбции кроличьей сыворотки культивируемыми клетками [27]. Может потребоваться раздельный анализ каждой линии клеток, поскольку конечный результат зависит от множественных взаимодействий между присутствующими антителами и спектром антигенов на поверхности каждого типа клеток.

Присутствие определенных аллоантигенов ЛАЧ на поверхности исследуемой линии клеток может быть подтверждено тестом на подавление абсорбции. Для этого способность клеток абсорбировать аллоантитела к ЛАЧ из антисыворотки с известной специфичностью определяется по степени потери цитотоксического эффекта после абсорбции. Оценка потери цитотоксичности проводится путем параллельного титрования антисыворотки до и после абсорбции панелями линий лимфоцитарных клеток с известными профилями ЛАЧ [27].

4.3.3. Дифференциальное окрашивание хромосом (G-сегментирование)

Надежным методом идентификации клеток, в ряде случаев близким к абсолютному, является хромосомный анализ после обработки трипсином и окраски по Гимза (выявление G-полос). Выявляемые этим методом особенности окраски сегментов хромосом являются характерными для каждой пары хромосом и позволяют опытному цитогенетику обнаруживать даже минорные инверсии, делеции и транслокации. Многие линии сохраняют множественные маркерные хромосомы, которые легко идентифицируются этим методом и могут служить специфическими положительными маркерами клеток.

Известны различные модификации исходного метода окраски на G-полосы [28]. Следующая модификация может быть применена к анализу препаратов распластанных метафазных

пластинок, получаемых согласно методике разд. 4.1.3 (этап X).

- I. Используйте высушенные на воздухе препараты в течение 2—7 сут после получения.
- II. Инкубируйте препараты в 0,025 М фосфатном буфере (ФБ; 3,4 г KH_2PO_4 в 1 л воды, pH 6,8) при 60 °C в течение 10 мин. Используйте ФБ во всех последующих операциях.
- III. Непосредственно перед использованием приготовьте красящий раствор, содержащий 6,5 мл ФБ, 0,55 мл раствора трипсина (1%-ный раствор трипсина Дифко, разведенный в 250 раз дистиллированной водой), 2,5 мл 100%-ного метанола и 0,22 мл раствора Гимза (коммерческий препарат). 1%-ный исходный раствор трипсина может быть заготовлен заранее и храниться при —70 °C.
- IV. Залейте каждый препарат 1 мл красящего раствора и оставьте на 15 мин.
- V. Быстро ополосните дистиллированной водой и высушите на воздухе.

Полностью высушенные препараты используются для микроскопического анализа без покровных стекол с планapoхроматным объективом с масляной иммерсией. Иммерсионное масло наносится непосредственно на предметное стекло. Следует соблюдать осторожность, чтобы не повредить клетки. Сразу после анализа следует как можно тщательнее удалить все иммерсионное масло. Обычно бывает достаточно нескольких промывок стекол в ксилоле. Типичный препарат хромосом, окрашенных на G-полосы, приведен на рис. 4.8.

Более полное описание метода и дополнительные примеры получения препаратов приведены в работах [29 и 30].

4.3.4. Другие методы

В настоящее время появились новые методы, обеспечивающие надежную идентификацию клеток, особенно клеток животных одного вида. Эти методы здесь не рассматриваются подробно, и желающие могут обратиться к работам [31 и 32].

Один из этих методов включает в себя двумерный электрофорез с высоким разрешением и подробно рассмотрен в обзоре Андерсона и сотрудников [31]. В основу метода положено разделение клеточных белков по двум независимым параметрам: молекулярной массе и изоэлектрической точке. Аналитическими методами, используемыми для проведения этих разделений, являются изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) в присутствии мочевины и электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия. Каждый из этих методов позволяет разделить более 100 белков. При комбинации этих методов в условиях двумерного разделения можно теоретически разделить 10 000 белков, но на



Рис. 4.8. Дифференциально окрашенные (на G-полосы) хромосомы клеток линии ATCC HTB 16 (U-138 MG), выделенных из глиобластомы человека (Фотография любезно предоставлена Т. Р. Чен.)

практике за один анализ разделяются около 2000 белков. Не все клеточные белки выявляются в стандартном геле, поскольку некоторые кислые и основные белки уходят за его пределы. Была разработана техника неравновесного градиента, позволяющая дополнительно выявить 1000 или 2000 белков из некоторых типов клеток.

Второй новый метод требует применения техники рекомбинантных ДНК и клонированных зондов ДНК для идентификации и количественной оценки аллельного полиморфизма. К настоящему времени выявлено более 100 полиморфных генов в геноме человека и установлена их хромосомная локализация; банк этих данных быстро увеличивается. Они оказываются чрезвычайно удобными маркерами, даже если эти гены не экспрессируются в структурные или ферментативно-активные белки. Скрининг этих маркеров с помощью блоттинга по Саузерну в настоящее время используется, хотя и в небольших масштабах, при идентификации клеточных линий [32].

Можно надеяться, что в течение ближайшего десятилетия использование одного или обоих этих методов приведет к однозначному типированию всех наиболее широко используемых клеточных линий.

4.4. Идентификация тканей, из которых получены линии клеток

Маркеры, используемые для выявления тканей, служивших источниками линий клеток, по-видимому, столь же многочисленны, как и типы клеток многоклеточных организмов. Главные средства включают в себя анализ тонкой структуры, иммунохимические тесты на цитоскелетные и тканеспецифические белки и, конечно, любые испытания из широкого спектра биохимических тестов на специфические функциональные свойства клеток разных тканей. Ниже приводятся некоторые наиболее общие методы, относящиеся к этой категории.

4.4.1. Тонкий структурный анализ для выявления характеристических маркеров

Присутствие десмосом или кератиновых филаментов, выявляемых с помощью электронного микроскопа, принято считать свойством эпителиальных клеток. Так называемые тельца Вейбеля — Палада специфичны для клеток эндотелия из пупочной вены и других источников. Клетки островков Лангерганса могут быть морфологически охарактеризованы присутствием в них специфических секреторных гранул.

Ниже приведены основные этапы подготовки культивируемых клеток для проведения такого тонкого структурного анализа. Список необходимых реагентов приведен в табл. 4.11. Подготовка клеточного монослоя или осадка клеток, отобранных из суспензионной культуры или диссоциацией монослоя, проводится в следующем порядке.

- I. Соберите клетки центрифугированием (не более $1-3 \cdot 10^6$ клеток) в стеклянных или полипропиленовых пробирках объемом 15 мл. Подготовка клеток монослоя для анализа может производиться непосредственно в культуральной пластиковой посуде.
- II. Слейте культуральную среду и промойте клетки исходным буфером при 4°C . Все последующие операции вплоть до (V) должны проводиться при этой температуре.
- III. Фиксируйте клетки в течение 1 ч 2%-ным забуференным глутаровым альдегидом. При фиксации отделите осадок клеток от дна пробирки с помощью стеклянной палочки для облегчения диффузии фиксатора со всей поверхности осадка. Важно сохранять клетки в плотном осадке, не давая им диссоциировать. Такие крупные конгломераты клеток будут осаждаться в более вязких жидкостях, используемых на последующих стадиях.
- IV. Слейте фиксатор и трижды промойте фиксированный материал буфером. Продолжительность каждой промывки не менее 10 мин.

Таблица 4.11. Реагенты¹⁾, используемые при подготовке культивируемых клеток к электронной микроскопии

Исходные растворы

1. На-какодилатный буфер 0,1 М рН 7,2—7,3

Какодилат натрия	42,8 мг
Феноловый красный — 0,5%-ный водный раствор	4 мл
Растворите в 1 л бидистиллированной воды и доведите рН с помощью 1 М HCl	
2. Глутаровый альдегид — 8%-ный водный раствор
Разведите 1 : 2 бидистиллированной водой
3. Четырехокись осмия — 4%-ный водный раствор
4. Уранилацетат — 0,5%-ный водный раствор
5. Цитрат свинца по Рейнольдсу

Нитрат свинца	1,33 г
Цитрат натрия (2H ₂ OX)	1,76 г
Бидистиллированная вода	30 мл

Растворяйте при помешивании в течение 30 мин. Добавьте 8 мл свободного от карбонатов 1 М NaOH и доведите БВ до 50 мл

Растворы, стабильные не менее 6 мес, следует перед употреблением пропускать через миллипоровый фильтр (диаметр пор 0,22 мкм и менее) для удаления возможного тонкого осадка

6. Набор спиртов вплоть до 100% (абсолютный) и пропиленоксид
7. Смолы для заключения

- | | |
|----------------------------------|--------|
| А. Эпон 812 | 62 мл |
| Додеценилantarный ангидрид (ДЯА) | 100 мл |
| Б. Эпон 812 | 100 мл |
| Мстилнадиновый ангидрид (МНА) | 89 мл |

Растворы можно приготовить заранее и хранить в плотно закрытых контейнерах при 4°C в течение по крайней мере 6 мес

Катализатор (2,4,6-три диметил-аминометил фенол) (ДМР 30) следует добавлять непосредственно перед использованием до концентрации 1,5—2%

Рабочие растворы

1. Забуференный глутаровый альдегид (2%): концентрированный буфер и 4%-ный раствор глутарового альдегида смешиваются в соотношении 1 : 1
2. Забуференная четырехокись осмия 1%: концентрированный буфер и 4%-ный раствор четырехокиси осмия смешиваются в соотношении 3 : 1
3. Смолы для заливки.

Тщательно смешать перед использованием 7 частей смеси Б с 3 частями смеси А и добавить катализаторы до концентрации 1,5-2%

¹⁾ Реактивы могут быть получены от фирмы Polysciences, Inc. Warrington, PA.

- V. Дополнительно фиксируйте материал 1%-ной четырехокисью осмия в течение 1 ч.
- VI. Слейте фиксатор и трижды промойте фиксированный материал БВ. Продолжительность каждой промывки не менее 5 мин.
- VII. Оставьте материал на 16—20 ч в 0,5%-ном растворе уранилацетата. Низкий рН раствора приводит к удалению гликогена, но способствует прекрасному сохранению и прокрашиванию мембран.

- VIII. Проведите материал через серию спиртов (10—30—70—95—100—100%-ные), выдерживая клетки в каждом растворе не менее 10 мин. При проводке осажденных клеток после спирта необходимо последовательно, в течение 10 мин, пропитать фрагменты клеточного конгломерата смесью 100%-ного спирта со 100%-ным пропиленоксидом (1:1), 100%-ным пропиленоксидом и смесью 100%-ного пропиленоксида со смолой для заливки (1:1). При проводке монослоя клеток на пластиковой поверхности последние три этапа можно опустить. В этом случае монослой клеток пропитывается 100%ным спиртом в течение 30 мин и затем смесью 100%-ного спирта со смолой для заливки (1:1).
- IX. Слейте последний раствор для проведения и начните пропитку материала 100%-ной смолой для заливки (смесь растворов Б и А в соотношении 7:3 и 1,5—2% ДМР 30, см. табл. 4.11). Оптимальным способом пропитки является внесение фрагментов с диаметром не менее 1 мм в специальные капсулы для заливки (ВЕЕМ, фирма Polysciences), заполненные смолой. Препараты вносятся в верхнюю часть капсул и в течение нескольких часов опускаются на дно капсул.
- При подготовке монослоя смола для заливки наливается в культуральный флакон и клетки пропитываются в течение 8—18 ч.
- Для удаления пузырьков воздуха капсулы ВЕЕМ с заключенным материалом или открытые культуральные сосуды поместите под вакуум.
- X. Проведите полимеризацию при 65—70 °C в течение 24 ч или более продолжительного времени до достижения необходимой твердости. Предложенное соотношение смеси Б/А обеспечивает достаточно высокую твердость и может быть модифицировано в соответствии с опытом и целью исследователя [33].
- XI. В случае монослоя вырежьте предназначенный для исследования участок пропитанных клеток с помощью тонкой алмазной пилки и приклейте его на временную пластиковую подставку. Лучше всего использовать быстро сохнущий контактный клей. Образцы могут быть затем ориентированы для получения поперечных срезов или для отбора срезов, тангенциальных к поверхности монослоя (например, при изучении десмосом). В случае осадка клеток срежьте кончик капсулы, заточите его в случае необходимости бритвой с одной режущей кромкой и установите в держателе микротом.
- XII. Срезы для электронно-микроскопического анализа получайте с помощью ультрамикротом (см. инструкции фирм-

изготовителей). Для получения увеличения в 15 000 раз и выше используйте серебристые и серые срезы. При меньшем увеличении можно использовать золотистые срезы.

XIII. Разместите срезы на подходящей сетке, окрасьте в течение 20—60 с цитратом свинца, исследуйте в электронном микроскопе и в случае необходимости сфотографируйте. Для более подробной информации следует обратиться к работам [33 и 34].

4.4.2. Иммунологические тесты на белки цитоскелета

Цитоплазматические промежуточные филаменты, которые образуют весьма существенную часть цитоскелета, оказались чрезвычайно удобными для идентификации клеток. На основе морфологии, полипептидного состава и уникальной иммуногенности можно различать по крайней мере 5 подгрупп филаментов. Было показано, что распределение этих подгрупп филаментов оказывается тканеспецифичным. Так, эпителий большинства органов содержит цитокератин (или цитокератины), а клетки мезенхимной ткани — виментин. Десмин присутствует в миогенных клетках, белок нейрофиламентов — в нейронах, а кислый белок фибрилл глии — в клетках глии [35].

Обнаружение филаментов может быть произведено с помощью электронной микроскопии или путем прямого или непря-

Таблица 4.12. Реагенты для иммуноцитохимического выявления кератина

1. Фиксатор	3%-ная H_2O_2 (50 мл) Безводный метанол (250 мл) Смешивать непосредственно перед использованием
2. Трис-буфер	0,1 М, pH 7,6; использовать для реагентов 3—6 и 8
3. Нормальная сыворотка	10%-ная свиная сыворотка в трис-буфере
4. Кроличья антикератиновая анти-сыворотка	От 1:20 до 1:100 в трис-буфере
5. Свиная антисыворотка к кроличьим IgG	1:20 в трис-буфере
6. Растворимые комплексы пероксидазы хрена с кроличьей антисывороткой к пероксидазе (ПАП)	1:100 в трис-буфере
7. Буфер для промывки	1 часть трис-буфера (0,5 М, pH 7,6) 9 частей 0,9% NaCl
8. Хромоген	3,3-Диаминобензидинтетрагидрохлорид (6 мг) 3%-ная H_2O_2 (0,1 мл) Трис-буфер (10 мл)

¹⁾ Наборы, предназначенные для этого метода [36], выпускаются фирмой DAKO Co., Santa Barbara, CA.

мого флуоресцентного окрашивания. Кроме того, можно выявить специфические белки цитоскелета иммуноцитохимически, как это показано ниже для кератина. Реагенты (табл. 4.12) и наборы для окрашивания белков цитоскелета поставляются многими фирмами.

Выявление кератина в клетках монослойной культуры на поровом стекле или в клетках, осажденных центрифугированием на предметное стекло, проводится следующим образом.

- I. Зафиксируйте клетки 20 мин в метаноле, содержащем 3%-ную H_2O_2 , и быстро (в течение 30 с) промойте в проточной водопроводной воде.
- II. Поместите препараты в буфер для промывки на 5 мин, извлеките и отсосите жидкость. На этой и всех последующих стадиях следует тщательно избегать подсушивания препаратов.
- III. Монослой клеток или «пятно» клеток, осажденных на предметное стекло, покройте нормальной забуференной сывороткой (табл. 4.12) и оставьте на 30 мин при комнатной температуре.
- IV. Отсосите сыворотку, добавьте разбавленную кроличью антисыворотку к кератину и оставьте на 30 мин при комнатной температуре.
- V. Отсосите сыворотку и осторожно промойте несколько раз буфером. Поместите препараты в бюксы с буфером для промывки и оставьте на 15 мин.
- VI. Отсосите жидкость, покройте препараты свиной антисывороткой к кроличьим IgG и оставьте на 30 мин.
- VII. Промойте несколько раз буфером для промывки, поместите на 15 мин в бюкс со свежим буфером для промывки и тщательно отсосите жидкость.
- VIII. Покройте клетки забуференным реагентом ПАП (см. табл. 4.12), проинкубируйте 30 мин при комнатной температуре, промойте несколько раз буфером для промывки и оставьте в бюксе со свежим буфером на 15 мин.
- IX. Отсосите жидкость, покройте клетки свежеприготовленным раствором хромогена и оставьте на 5 мин.
- X. Осторожно промойте бидистиллированной водой, окрасьте гематоксилином, обезводьте и заключите в Парамант.

Указанием на положительную реакцию служит локальное отложение продукта реакции — темно-коричневого преципитата. Отрицательные контроли, ставящиеся параллельно с исследуемыми образцами, представляют собой препараты клеток на стеклах, обработанные на этапе IV буфером для промывки вместо антикератиновой антисыворотки. В качестве положительного контроля можно использовать линии клеток карцином, такие как SCC4 или SCC15, или даже срезы кожи. Более подробно с этим методом можно ознакомиться в работах [35 и 36].

4.4.3. Выявление тканеспецифических антигенов

Вопросам выделения и изучения свойств ткане- и опухоле-специфических антигенов посвящено немало исследований. Методы этих исследований различны в разных лабораториях и зависят также от типа линий клеток и тканей. Ниже приведено лишь несколько примеров, дающих представление о перспективах этих исследований.

Линия опухолевых клеток легкого человека 2563 (полученная из опухоли МАС-21) была использована Акесоном [37] непосредственно в качестве антигена для кроликов. При анализе полученной антисыворотки с помощью реакции связывания комплемента, иммунофлуоресцентного теста и метода насыщающего связывания в ней обнаружили антитела, специфические для антигенов нормальной ткани почек. Эти антитела могли быть избирательно адсорбированы препаратами легочной ткани; следовательно, существует антиген, общий для этих двух нормальных органов.

Сериани с сотрудниками предоставили данные, показывающие наличие специфических антигенов молочной железы в нормальных и опухолевых клетках молочной железы. Эти исследователи иммунизировали кроликов обезжиренным препаратом верхней фракции отстоянного молока человека. Видоспецифические антитела удалялись из этой сыворотки путем адсорбции на эритроциты человека. Результаты непрямого иммунофлуоресцентного анализа показали, что антитела, содержащиеся в такой антисыворотке, специфически связываются с линиями клеток нормальной молочной железы и карциномы молочной железы человека. Был предложен чувствительный метод радиоиммуноанализа, позволивший получить количественное подтверждение этих результатов. Семь линий карциномы молочной железы и первичные культуры эпителия молочной железы связывали по крайней мере в 10—30 раз больше антител, чем фибробласты молочной железы и эпителиальные клетки из других источников. Трипсинизация клеток MCF-7 и МДА-MB-157 приводила к снижению реактивности клеток на 80—84%, что указывало на поверхностную локализацию антигенов, специфических для молочной железы [38].

Чу с сотрудниками разработали методы выделения, очистки и количественного определения антигена предстательной железы. Этот антиген выделяли из семенной жидкости или ткани предстательной железы человека. Грубые экстракты тканей обрабатывали сульфатом аммония и преципитируемый материал растворяли, диализовали и далее очищали путем колоночной хроматографии (ДЭАЭ и сефадекс). Фракции с мол. массой 26—37 кД, содержащие антиген предстательной железы, кон-

центрировали ультрафильтрацией, и полученный препарат использовали для иммунизации кроликов [39].

Оказалось, что получаемая антисыворотка характеризуется реакцией лишь с экстрактами предстательной железы при иммунодиффузии и не взаимодействует с аналогичными препаратами других тканей. Более того, количественные исследования, проведенные после разработки чувствительного иммуноферментного метода анализа для антигена предстательной железы, показали, что линии клеток человека, полученные из карциномы предстательной железы (LNCaP и PC-3), экспрессируют этот антиген, а в линиях клеток, полученных из других тканей, этот антиген отсутствует.

Во многих лабораториях были получены и охарактеризованы гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела с высокой степенью тканевой специфичности. Так, например, в работе Копровски с сотрудниками [40] сообщалось о выделении 19 гибридом, 15 из которых продуцируют антитела, реагирующие лишь с линиями клеток карцином прямой или толстой кишки. Метцгар с сотрудниками [41] получили 5 гибридом, продуцирующих антитела к линиям клеток опухолей поджелудочной железы человека. В этой работе отмечена некоторая перекрестная реактивность с другими опухолевыми тканями или линиями клеток, но по крайней мере в одном случае (антитела DU-PAN-1) эта перекрестная реактивность ограничена клетками карциномы переходного эпителия мочевого пузыря. Известны также гибридомы, продуцирующие антитела, позволяющие различать В- и Т-клетки, а также субклассы Т-клеток человека [42], и к настоящему времени в свободной продаже имеются многие реагенты и наборы для решения этих задач.

Вследствие широкой доступности моноклональных реагентов исследователь вправе ожидать, что наборы для идентификации клеток из многих тканей войдут в практику лабораторных исследований. Эти антитела в конечном счете вытеснят гетерогенные антисыворотки, используемые в настоящее время в этих целях.

4.4.4. Биохимическое тестирование специфических функций клеток

Принадлежность большого числа линий и штаммов клеток к той или иной индивидуальной ткани или опухоли может быть показана по способности клеток к специфическому синтезу или наличию специфического метаболического пути. Способов такой проверки слишком много, чтобы их можно было рассмотреть здесь в деталях. Ограничимся лишь несколькими примерами линий и штаммов, в которых выявляется экспрессия специфических функций.

Яшумура с сотрудниками [43] использовали перевиваемые опухоли мыши и крысы в качестве источников для получения четырех клонированных штаммов функционально активных клеток. На ранних стадиях получения этих клонов для индукции роста требовались чередующиеся периоды трансплантации клеток организмам-хозяевам и поддержания этих клеток в культуре. Один штамм, получивший название GH₁ и выделенный исходно из опухоли гипофиза MtT/W5, секретировал гормон роста, вызывал рост хозяев при прививке интактным животным, или животным, у которых удален гипофиз. Второй штамм I-10 был получен из опухоли клеток Лейдига H10119, перевиваемой на мышцах BALB/c1. Прогестерон и его производное 20 α -окси-4-прегнен-3-он оказались основными стероидами, секретируемыми этими клетками в культуральную среду. Процесс высвобождения этих гормонов оказался нечувствительным к гормону, стимулирующему интерстициальные клетки, но усиливался циклическим AMP. Культивируемые штаммы мышечных клеток M-3 и Y-1 были получены соответственно из меланомы Клаудмана S91 и из опухоли надпочечника. Клетки M-3 индуцировали развитие меланом при прививке определенным животным (мышь CXDBA). Клетки надпочечника (штамм Y-1) чувствительны к АКГГ и секретируют стероидные гормоны.

Метод клонирования успешно применяется и для получения штаммов функционирующих клеток из нормальных тканей. Примером служит штамм клеток щитовидной железы крысы (клетки FRTL). Эти клетки секретируют в культуральную среду тироглобулины, повышая концентрацию иодидов в 100 раз [44]. Для культивирования этих клеток используется среда F-12M, содержащая инсулин, тиротропин, трансферрин, гидрокортизон, соматостатин, глицил-L-гистидил-L-лизинацетат и всего 0,1—0,5% телячьей сыворотки. Как уже говорилось, низкое содержание сыворотки в среде может быть критичным на ранних стадиях отбора клеток функционального типа. Из нормальных мышц мышей и крыс получены также штаммы миогенных клеток. В этих случаях в качестве биохимического маркера может быть использована удельная активность креатинфосфокиназы [45].

Линии функциональных клеток могут быть также получены из различных опухолей человека. Линия клеток MCF-7, например, получена из плеврального выпота больной с аденокарциномой молочной железы. Клетки этой линии сохраняют некоторые признаки эпителия молочной железы, например чувствительность к опосредуемому цитоплазматическими рецепторами действию эстрадиола и способность к образованию куполообразных структур в плотном монослое [46]. Клетки BeWo представляют собой линию трофобластных клеток человека, полученных из злокачественной хориокарциномы. Оказалось, что

клетки этой линии секретируют целый ряд плацентарных гормонов, включая хорионический гонадотропин человека, плацентарный лактоген и стероиды (эстрон, эстрадиол, эстриол и прогестерон) [8]. Дополнительные данные о линиях дифференцированных клеток и получении их биохимических характеристик можно найти в работах [7, 8 и 47].

4.5. Идентификация и количественная оценка иммунологических продуктов

Принимая во внимание широкое использование гибридомной технологии, никакой обзор свойств клеточных линий не будет полным, если в нем не будет упомянута эта область исследований. Наиболее надежным критерием идентификации является, естественно, специфичность моноклональных антител, продуцируемых гибридомой. Если этот клеточный продукт отсутствует и его синтез не может быть восстановлен, то линия гибридомных клеток ценности не представляет. Однако потенциальное количество различных гибридом, теоретически равное числу существующих эпитопов, намного превышает число имеющихся различных линий слившихся клеток. Это создает проблему для любого учреждения, создающего банк гибридом, поскольку ни одна индивидуальная организация не в состоянии идентифицировать все моноклональные антитела даже в современной ситуации, когда количество антител относительно невелико.

В связи с этим можно рассмотреть компромиссное решение, принятое АТСС. Представительство банка гибридом может определить класс, подкласс и количество секретируемых гибридомой иммуноглобулинов и провести оценку других стандартных признаков линии клеток (см. рис. 4.1). Кроме того, может быть установлена картина ИЭФ продуцируемых молекул иммуноглобулина. Этой информации может оказаться достаточно для выявления перекрестного загрязнения.

4.5.1. Применение теста Охтерлони для обнаружения изотипов иммуноглобулинов

Метод Охтерлони для определения изотипов иммуноглобулинов, продуцируемых гибридомами, является относительно простым. В табл. 4.13 приведена процедура приготовления агаровых пластинок.

- I. Получите образцы от каждой испытываемой культуры гибридом, приближающейся к максимальной клеточной плотности, и соберите супернатант после центрифугирования (200 g, 10 мин).
- II. Поместите по 35 мкл супернатанта во внешние лунки. В случае низкого титра антител в культуральной среде

Таблица 4.13. Получение пластинок для теста Охтерлони

1. Агарозу и азид натрия растворите в ФБ до концентрации 0,8 и 0,25 % соответственно путем нагревания в кипящей водяной бане
2. Добавьте 10 капель 0,5%-ного водного раствора трипанового синего к 250 мл раствора и осторожно перемешайте
3. Перенесите по 1,5—2 мл горячего раствора в чашки Петри размером 60×15 мм для создания тонкого слоя на дне чашек. Во время затвердевания этого слоя сосуд с оставшимся раствором агарозы держите в водяной бане при 56 °С
4. После затвердения первичного слоя добавьте примерно по 4 мл раствора агарозы в каждую чашку и дайте образоваться вторичному слою
5. Сделайте лунки в центре и по периферии агаровой пластинки, используя трубчатое сверло для пробок. Отсосите из лунок вторичный верхний слой, используя пипетку, соединенную с любым вакуумным устройством
6. До использования храните пластинки в холодильнике

может возникнуть необходимость повторного внесения супернатанта в ту же лунку вплоть до 4 раз.

- III. Поместите 35 мкл специфической типизирующей антисыворотки к мышинным иммуноглобулинам в центральную лунку.
- IV. Инкубируйте пластинки при комнатной температуре во влажной атмосфере в течение ночи и на следующий день просмотрите их. Между лункой с супернатантом положительной гибридомы и центральной лункой со специфическими антителами к известному иммуноглобулину должна образоваться линия преципитации. Типичный пример приведен на рис. 4.9.

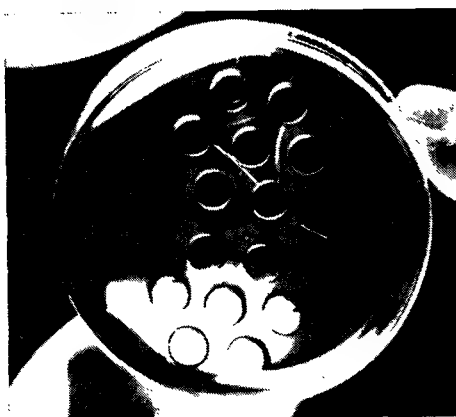


Рис. 4.9. Тест на изотип антител по методу Охтерлони. Полоса преципитации между центральной и какой-либо периферической лунками характеризует положительный ответ.

4.5.2. Определение количества секретируемого иммуноглобулина методом радиальной иммунодиффузии

После того как идентифицирован изотип, можно определить количество иммуноглобулина, продуцируемого гибридомой. Соответствующую типизирующую антисыворотку смешайте с агаром (табл. 4.14). Добавьте концентрированный раствор супернатанта гибридомы в лунку для антигена в агаровом слое. По мере диффузии антигена из лунки в агар вокруг лунки образуется кольцо преципитата антиген-антитело. Измерьте диаметр кольца и по стандартной кривой определите количество внесенного в лунку антигена. После получения агаровых пластинок присту-

Таблица 4.14. Приготовление диффузионных пластинок

Буфер	Растворите 0,5 г K_2HPO_4 и 0,6 г NaCl в 100 мл бидистиллированной воды и доведите pH до 8,0
Агаровая основа	Добавьте 1,5 г агара Noble к 50 мл буфера и растворите в кипящей водяной бане. Храните в холодильнике порциями по 5—10 мл
Смесь антисыворотки с агаром	Разведите типизирующую антимышиную антисыворотку кролика в буфере pH 8,0 (1:10) и нагрейте раствор до 56°C в водяной бане. Агаровую основу растворите в кипящей водяной бане и охладите до 56°C После уравнивания температур смешайте равные объемы двух растворов, перенесите немедленно на предметное стекло и дайте затвердеть

пайте к определению количества иммуноглобулина согласно следующей схеме.

- I. Соберите 25 мл бесклеточного супернатанта исследуемой культуры гибридомы, выросшей до плотности, близкой к максимальной, и охладите до 4°C.
- II. Осадите белки, добавляя 25 мл насыщенного раствора сульфата аммония при 4°C и центрифугируйте при 10 000 g в течение 30 мин.
- III. Отбросьте супернатант и растворите осадок в 1—3 мл дистиллированной воды. Запомните конечный объем и степень концентрирования иммуноглобулинов (обычно в 8—16 раз). Вплоть до проведения опытов храните при —60°C.
- IV. Сделайте 12 лунок диаметром 3 мм на расстоянии 12 мм друг от друга в агаре диффузионной пластинки, используя трубчатое сверло для пробок. Содержимое лунок отсосите пастеровской пипеткой, соединенной с любым стандартным вакуумным устройством.
- V. Внесите по 10 мкл концентрированного раствора антител в каждую лунку для испытания.
- VI. Для получения стандартной кривой внесите в лунки по 10 мкл серийных разведений соответствующих очищенных

мышинных иммуноглобулинов, включая концентрации 1; 0,5; 0,25 и 0,125 мг/мл.

VII. Поместите пластинки в герметичную влажную камеру при комнатной температуре и оставьте на 16—18 ч.

VIII. Измерьте диаметры колец преципитации и определите количество присутствующего иммуноглобулина, пользуясь стандартной кривой.

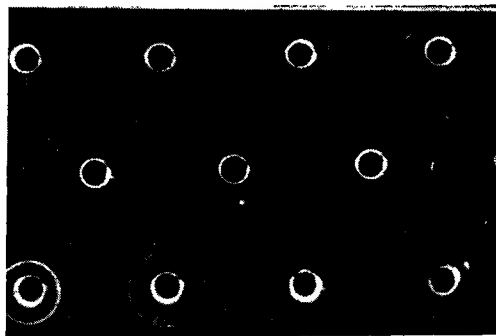


Рис. 4.10. Оценка с помощью иммунодиффузии количества иммуноглобулинов, продуцируемых различными линиями гибридом. Верхние лунки содержат исследуемый материал, а в нижние лунки вносится известное количество иммуноглобулина (1,25—10 мкг), используемого в качестве стандарта. (Фотография любезно предоставлена В. Сигель.)

Многие гибридомы продуцируют 25—75 мкг иммуноглобулина на 1 мл культуральной среды. Фотография, показывающая результаты типичного анализа, приведена на рис. 4.10.

4.5.3. Метод изоэлектрической фокусировки (ИЭФ) для дальнейшей идентификации

Большинство гибридом получено путем слияния с линиями мышинных клеток, экспрессирующих одни и те же H-2 детерминанты, и многие гибридомы синтезируют иммуноглобулины того же идиотипа. Следовательно, нужны иные способы идентификации секретируемых антител. ИЭФ обеспечивает разделение по крайней мере 50 000 мышинных иммуноглобулинов, поэтому этот метод часто используется для дальнейшей характеристики линий гибридом. Прописи агарозной основы и других растворов приведены в табл. 4.15.

Получение супернатанта гибридомы производится следующим образом.

I. Клетки гибридомы (желательно на стадии логарифмического роста) перенесите в какую-либо обогащенную, химически определенную среду, например в среду RPMI

1640, содержащую инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл) и натриевую соль селеновой кислоты (5 мкг/мл). Сыворотка в стандартных средах может мешать проведению ИЭФ.

- II. Промойте популяцию клеток тремя сменами этой среды, каждый раз собирая клетки центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. Ресуспендируйте осадок, не сни-

Таблица 4.15. Реагенты для ИЭФ иммуноглобулинов гибридом

Агароза 1	1%-ный (вес/объем) раствор в дистиллированной воде. Растворите нагреванием на кипящей водяной бане и до использования держите при 56 °C
Предварительно смешанные амфолиты	Для диапазона pH 3,5—9,5 (имеются в свободной продаже ¹⁾)
Фиксатор	Метанол (150 мл) Трихлоруксусная кислота 100%-ная (вес/объем) (25 мл) 20%-ная сульфосалициловая кислота (86 мл) БВ (350 мл) 0,01 M KCl
Собирающая среда	
Раствор для отмывки	Этанол (700 мл) Уксусная кислота (200 мл) БВ (1100 мл)
Краситель	500 мл раствора для отмывки 2,5 г Кумасси голубого. Фильтровать перед использованием
Катодный электролит	1,0 M NaOH
Анодный электролит	1,0 M H ₃ PO ₄

¹⁾ FMC Corporation, Rockland, Maine.

жая по возможности исходного отношения числа клеток к объему среды.

- III. Инкубируйте клетки гибридомы в этой среде при 37 °C в течение 5 сут, затем осадите клетки центрифугированием и соберите супернатант.
- IV. Концентрируйте белки супернатанта преципитацией сульфатом аммония, как и в системе иммунодиффузии (разд. 4.5.2). Концентрация белка для ИЭФ должна быть не ниже 1,7—2 мг/мл. Может возникнуть необходимость пропустить концентрированный раствор белка через колонку с сефадексом G-25 для удаления следов сульфата аммония, мешающего проведению ИЭФ.

Для проведения фокусировки могут быть использованы агарозные гели в специальных аппаратах для электрофореза (например, Pharmacia FBE 3000 с источником питания ECPS 3000/150).

- I. Добавьте 1,25 мл амфолитов (2,5%), имеющих рН 3,5—9,5, к 20 мл расплавленной агарозы при 56 °С и осторожно перемешайте.
- II. Распределите раствор агарозы равномерно по поверхности поддерживающей гель гидрофобной пленки (110×125 мм) прогретой пипеткой на 25 мл и отцентрируйте, используя формовочный спейсер.
- III. Дайте агарозе затвердеть, уберите спейсер и оставьте гель во влажной камере при 4 °С на 1 ч. Рекомендации по приготовлению и установке гелевых пластин можно найти в проспектах фирм — изготовителей приборов для ИЭФ.
- IV. Поместите трафарет с сеткой на столик прибора, используя в качестве изолятора керосин. Удалите пузырьки воздуха и включите циркуляцию воды, охлаждающей столик (5—10 °С).
- V. Тщательно удалите капли конденсата с пластины геля, используя для этой цели фильтровальную бумагу, и поместите гель на трафарет с сеткой.
- VI. Вырежьте электродные полосы бумаги длиной 85 мм, намочите каждую в соответствующем электролите и наложите на гель, тщательно соблюдая параллельность на расстояниях 5 мм от анодного и катодного концов.
- VII. Установите на гель трафарет с прорезями на расстоянии 25 мм от катода и нанесите в прорези растворы стандартов (10 мкл) и исследуемые растворы (15 мкл, содержащие не менее 25 мкг белка). Крайние прорези оставьте пустыми во избежание краевых эффектов.
- VIII. Установите крышку с электродами, контролируя равномерность их контакта с электродными полосками бумаги. Подключите источник питания постоянной мощности с напряжением 3000 В и током 150 мА.
- IX. Через 25 мин отключите питание, удалите остаточную жидкость образцов, конденсат и накладной трафарет и продолжите разделение в течение еще 60 мин. В течение всего периода при необходимости отсасывайте образующийся конденсат.

После окончания ИЭФ отключите источник питания и проведите отбор образцов гелевой пластинки, фиксацию, окрашивание и промывку в следующей последовательности.

- I. Тщательно промокните гель и вырежьте 16 маленьких дисков вдоль анодно-катодного градиента. Поместите диски в пронумерованные пробирки, содержащие по 1 мл 0,01 М KCl.
- II. Поместите гель в плоский контейнер, добавьте на 10 мин фиксирующий раствор и трижды промойте бидистиллированной водой.
- III. Тщательно смешайте содержимое пробирок, полученных

- на этапе (I), и определите значение pH в течение 4—24 ч.
- IV. Поместите на поверхность геля фильтровальную бумагу и, перевернув всю конструкцию, уложите ее на несколько слоев бумажных салфеток. На поддерживающую пленку положите небольшой груз.

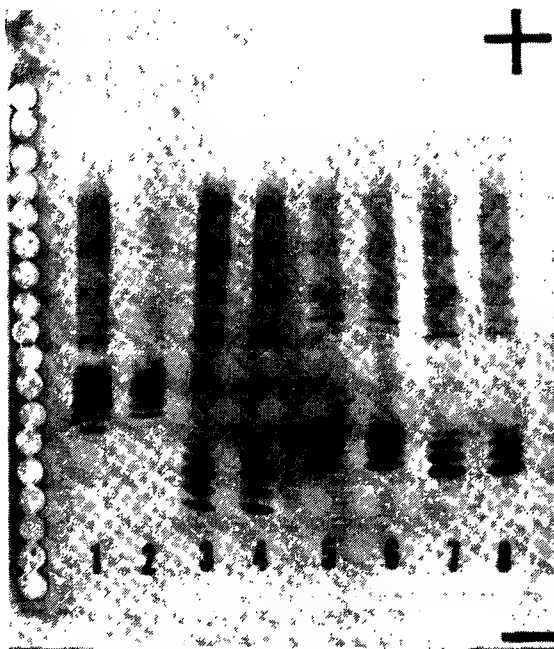


Рис. 4.11. Результаты изоэлектрического фокусирования четырех линий гибридом. Каждый образец в концентрации 1—1,5 мг/мл наносился на 2 дорожки. Дорожки 1 и 2: ATCC.HB2 (T3-A1); дорожки 3 и 4: ATCC.HB5 (16-3-22S); дорожки 5 и 6: ATCC.HB6 (17-3-3S); дорожки 7 и 8: ATCC.HB8 (19/178C₁). (Фотографии любезно предоставлены Ю. Рейд и А. Хэмбургер.)

- V. Через 20—30 мин удалите салфетки и подсушите гель струей горячего воздуха. Увлажните поверхность листа фильтровальной бумаги водой и осторожно отделите бумагу от геля.
- VI. Повторно подсушите гель и окрасьте его раствором Ку-масси голубого в течение 10 мин. Тщательно промойте пластинку водой и оставьте на ночь в растворе для отмывки (смесь этанола с уксусной кислотой).
- VII. Тщательно высушите гель, подсчитайте количество полос и отметьте их положение относительно профиля pH, определенного на основании измерений на этапе (III).

Фотография окрашенного геля приведена на рис. 4.11. В работе [8] приведены результаты применения ИЭФ в случае большого количества гибридом. Более подробно с методом ИЭФ можно ознакомиться в работе [48].

5. Банки данных о происхождении клеток

В настоящее время в банках клеток и в отдельных лабораториях хранится большое количество линий клеток. Во многих случаях данные о доступности и специфических свойствах этих линий не находят широкого распространения. Между тем информация подобного рода особенно нужна в случае гибридом: во-первых, из-за важности новых технологий для развития гибридомных исследований; во-вторых, при каждом слиянии клеток можно получать большое количество, возможно, уникальных гибридом.

Любой организации, будь то институт или банк клеток, трудно характеризовать, систематизировать и распространять все линии существующих гибридом. Поэтому были выбраны группы заинтересованных ученых и организаций для создания компьютеризованных банков соответствующей информации о тысячах клеточных линий, которые могут быть использованы научными и образовательными учреждениями. Роль этих информационных банков клеточных источников (CSIB — от английского cell source information bank) состоит в систематизации потока информации, касающейся происхождения и уникальных свойств специализированных линий клеток и гибридом. Информационные банки не выдают сертификатов или индоссаментов. В большинстве случаев клетки поставляются индивидуальными учеными или организациями, участвующими в программе.

CSIB организованы сравнительно недавно. Количество их и развитие зависят от субсидирования, от организаций, участвующих в создании банков, а также пользующихся их услугами. АТСС явилась инициатором создания широкого круга финансируемых программ такого типа в 1977 г., и в настоящее время обладает информацией о происхождении около 6000 линий и штаммов клеток многоклеточных организмов, многие из которых уже занесены в каталоги. Известны и другие национальные клеточные банки, такие как хранилище генетически мутантных клеток человека при Институте медицинских исследований в Кэмдене, Нью Джерси, и коллекция культур клеток животных при Лаборатории службы общественного здоровья в Портон Даун, Солсбери, Великобритания. Эти национальные банки снабжают информацией не только о линиях клеток в их коллекциях, но и о доступности линий определенных клеток, хранящихся в других банках.

5.1. Банк данных по гибриdomам CODATA-IUIS

Основателями банка данных о клонированных линиях клеток и их иммунореактивных продуктах явились Комитет по сбору научных и технологических данных (CODATA) и Международный союз иммунологических обществ (IUIS). В создании этого банка участвовали также Всемирная организация здравоохранения и АТСС. В настоящее время в работе этого банка принимают участие и другие научные организации, включая Межведомственную комиссию по сбору информации в области науки и техники (MIDST) во Франции, Институт физических и химических исследований (RIKEN) в Японии, Национальный швейцарский фонд научных исследований в Швейцарии, Совет медицинских исследований Великобритании и Национальные институты здоровья (NIAID, NIDR, NIGMS, NCI, DDR), а также Управление по контролю пищевых продуктов и лекарств США.

Этот банк предназначен для использования научными организациями, и его работа планируется и управляется тактической группой «CODATA Гибридома», состоящей из 9 иммунологов, представляющих различные национальные центры.

Если вы хотите внести в банк линию клеток, необходимо выполнить ряд формальностей. Данные, включая фамилию и адрес вступающего, литературные ссылки на предлагаемый штамм (если таковые имеются), предназначение гибридомы, описание растворимого продукта, метод выявления, доступность клеток или супернатанта и тому подобное записываются создателем линии гибридомы в форме, удовлетворяющей АТСС. При внесении линии клеток в память банка никакая информация не является лишней.

Программа не связана с получением дохода. По мере заполнения банка данными ответы на запросы делаются бесплатно.

5.2. MIRDAB

Банк микробиологических данных (MIRDAB) был основан *Excerpta Medica*. Целью работы этого банка является хранение и в конечном счете выдача данных о клетках животных и растений, микроорганизмах, вирусах, бактериофагах, плазмидах, генах и векторах генов.

Выработаны отдельные формы получения информации о клетках животных и растений, вирусах, и в настоящее время они могут быть получены от издательства Elsevier Science. По договоренности может быть получена информация о фамилии и адресе создателей линий клеток, истории получения ли-

нии, требующихся среде и субстратах, литературные ссылки по этой линии, а также данные о секретируемых антителах и других продуктах, доступности и т. д.

6. Благодарности

Автор благодарит многих сотрудников Отдела клеточных культур за помощь и предоставление различных протоколов, приведенных в этой главе. Особая признательность выражается М. Мэси и Т. Чен за замечания и предложения, высказанные при прочтении главы. Работа проводилась на средства Национального ракового института и Национального института здоровья.

Литература

1. Schaeffer W. I. (1979). In Vitro, **15**, 649.
2. Nelson-Rees W. A., Flandermeyer R. R. (1977). Science (Wash.), **195**, 1343.
3. Nelson-Rees W. A., Flandermeyer R. R. (1981). Science (Wash.), **212**, 446.
4. Nelson-Rees W. A., Flandermeyer R. R., Hawthorne P. K. (1974). Science (Wash.), **184**, 1093.
5. Barile M. F. (1977). In: Cell Culture and Application, Action R. T., Lynn J. D. (eds.), Academic Press, London and New York, p. 291.
6. McGarrity G. J. (1982). Adv. Cell Culture, **2**, 99.
7. Hay R. J., Williams C. D., Macy M. L., Lavappa K. S. (1982). Am. Rev. Respir. Dis., **125**, 222.
8. Hay R. J., Macy M. L., Hamburger A., Weinblatt A., Chen T. R. (1983). American Type Culture Collection Catalogue II, 4th edn., Rockville, MD, p. 12.
9. Hay R. J. (1984). In: Markers of Colonic Cell Differentiation, Wolman S. R., Mastromarino A. J. (eds.), Raven Press, New York, p. 3.
10. Stulberg C. S. (1973). In: Contamination in Tissue Culture, Fogh J. (ed.), Academic Press, London and New York, p. 1.
11. Macy M. L. (1978). Tissue Culture Association Manual, **4**, 833.
12. Hsu T. C., Benirschke K. (1967—1975). An Atlas of Mammalian Chromosomes, 9 volumes, published by Springer-Verlag, New York, Heidelberg and Berlin.
13. Dilworth S., Hay R. G., Daggett P.-M. (1979). Tissue Culture Association Manual, **5**, 1107.
14. Freshney R. I. (1983). Culture of Animal Cell, Published by Alan R. Liss, Inc., New York.
15. Cour I., Maxwell G., Hay R. J. (1979). Tissue Culture Association Manual, **5**, 1157.
16. Macy M. L. (1980). Tissue Culture Association Manual, **5**, 1151.
17. Rovozzo G. C., Burke C. N. (1973). A Manual of Basic Virological Techniques, Published by Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
18. Hay R. G., Kern J., Caputo J. (1979). Tissue Culture Association Manual, **5**, 1127.
19. Povey S., Hopkinson D. A., Harris H., Franks L. M. (1976). Nature, **264**, 60.
20. O'Brien S. J., Kleiner G., Olson R., Shannon J. R. (1977). Science (Wash.), **195**, 1345.

21. O'Brien S. J., Shannon J. E., Gail M. H. (1980). *In Vitro*, **16**, 119.
22. Wright W. C., Daniels W. P., Fogh J. (1981). *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 239.
23. Rutzky L. P., Siciliano M. J. (1982). *J. Natl. Cancer Inst.*, **68**, 81.
24. Halton D. M., Peterson W. D., Jr., Hukku B. (1983). *In Vitro*, **19**, 16.
25. Nichols E. A., Ruddie F. H. (1973). *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 1066.
26. Stoner G. D., Katoh Y., Foidart J.-M., Trump B. F., Steinert P. M., Harris C. C. (1981). *In Vitro*, **17**, 577.
27. Pollack M. S., Heagney S. D., Livingston P. O., Fogh J. (1981). *J. Natl. Cancer Inst.*, **6**, 1003.
28. Seabright M. (1971). *Lancet*, **2**, 971.
29. Sun N. C., Chu E. H. Y., Chang C. C. (1973). *Mammalian Chromosome Newsletter*, Jan., 26.
30. Chen T. R., Hay R. J., Macy M. L. (1982). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **6**, 93.
31. Anderson N. G., Anderson N. L. (1979). *Behring Inst. Mitt.*, **63**, 169.
32. Naylor S. L. (1984). *In Vitro*, in press.
33. Luft J. H. (1961). *J. Biochem. Cytol.*, **9**, 409.
34. Rash J. E., Fambrough D. (1973). *Dev. Biol.*, **30**, 166.
35. Ramaekers F. C. S., Puts J. J. G., Kant A., Moesker O., Jap P. H. K., Vooijs G. P. (1982). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **46**, 331.
36. Schlegel R., Banks-Schlegel S., McLeod J. A., Pinkus G. S. (1980). *Am. J. Pathol.*, **101**, 41.
37. Akeson R. (1977). *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**, 863.
38. Sasaki M., Peterson J. A., Ceriani R. L. (1981). *In Vitro*, **17**, 150.
39. Papsidero L. D., Kuriyama M., Wang M. C., Horoszewicz J., Leong S. S., Valenzuela L., Murphy G. P., Chu T. M. (1981). *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 37.
40. Koprowski H., Steplewski Z., Mitchell K., Herlyn M., Herlyn D., Fuhrer P. (1979). *Somatic Cell Genet.*, **5**, 957.
41. Metzgar R. S., Gaillard M. T., Levine S. J., Tusk F. L., Bossen E. H., Borowitz M. J. (1982). *Cancer Res.*, **42**, 601.
42. Kung P. C., Goldstein G., Reinherz E. L., Schlossman S. F. (1979). *Science (Wash.)*, **206**, 347.
43. Yasumura Y., Tashjian A. H., Jr., Sato G. H. (1966). *Science (Wash.)*, **154**, 1186.
44. Ambesi-Impombato F. S., Parks L. A. M., Coon H. G. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 345.
45. Kimes B. W., Brandt B. L. (1976). *Exp. Cell Res.*, **98**, 349.
46. Soule H. D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M. (1973). *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1409.
47. Wigley C. B. (1975). *Differentiation*, **4**, 25.
48. Reid Y., Breth L., Hamburger A. W. (1984). *J. Tissue Cult. Methods*, in press.

РАЗДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК ЭЛЮТРИАЦИЕЙ

Д. Конки

1. Введение

Во многих экспериментах, связанных с биологией клетки, исследование клеточной популяции, состоящей из клеток одного типа, оказывается намного перспективнее исследований смешанных клеточных популяций. Как бы в развитие этой концепции, изучение функций клеток на разных стадиях клеточного цикла требует получения гомогенных клеточных популяций, разделенных, а следовательно, и синхронизированных в соответствии с их положением в цикле клеточного деления.

Между 1965 и 1970 гг. успешное развитие методов изопикнического (плавучая плотность) и скоростного центрифугирования в отдельности или в комбинации привело к появлению многочисленных публикаций о перспективных разделениях клеток. Однако еще до этого периода всеобщего интереса к разделению клеток Линдал в 1948 г. [1] описал центрифугу и камеру для разделения с помощью так называемого «противоточного центрифугирования». Начиная с 1955 г. этот аппарат использовался Линдалом и его сотрудниками для выделения специфических типов клеток из смешанных клеточных популяций, например премитотических и митотических клеток из асинхронно пролиферирующих популяций клеток асцитной опухоли [2]. Этот метод получил название элютриация или элютриационное центрифугирование [3].

2. Методы разделения клеток

Теория седиментации применительно к клеткам подробно рассмотрена в недавно опубликованном обзоре [4]. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности требует достаточно высокой скорости вращения и/или достаточно продолжительного времени, чтобы клетки смогли перераспределиться вдоль градиента в соответствии с их плавучей плотностью. Этот метод имеет известные ограничения, поскольку разделение клеток производится в соответствии с их плотностью, а плавучие плотности многих типов клеток частично перекрываются [5]. Другими недостатками этого метода являются необходимость приложения больших центробежных сил и возможная токсичность материалов, используемых для создания

градиента. Тем не менее в сочетании с методом скоростной седиментации этот метод позволяет получать высокообогащенные популяции жизнеспособных клеток. Так, из популяции кроветворных клеток можно выделить 80—100% эритропоэтических стволовых клеток и разделить их путем центрифугирования в градиенте Перколл [6] на клетки, находящиеся в S-фазе и остальные.

Разделение клеток с помощью скоростного центрифугирования проводится как на основе плавучей плотности клеток, так и их диаметра. Седиментация в поле силы тяжести является удобным и технически простым методом, и существенным преимуществом этого метода является возможность использования недорогого оборудования, такого как аппараты Стапут [8] или камера ЦелСеп [9] (Du Pont Ltd).

Аппараты могут быть использованы для нанесения ограниченного количества клеток (максимум 10^8 клеток) на поверхность градиента сыворотки, бычьего сывороточного альбумина или фиколла. При большом количестве клеток создаются проблемы на границе раздела градиента и образца, где клетки «проваливаются» в градиент. Этого можно избежать, если создавать промежуточный слой между клетками и градиентом. Главным недостатком седиментации в поле силы тяжести является длительность разделения.

Седиментация в изокINETическом градиенте (например, Фиколл в среде культуры ткани) также обеспечивает возможность удобного разделения клеток в стерильных условиях с использованием стандартного и доступного оборудования. Как и центрифугирование в поле силы тяжести, этот метод применим к разделению малого числа клеток.

Теория элютриационного центрифугирования обсуждается в работе Сэндерсона с сотрудниками [10]. При низкой силе тяжести эта система позволяет разделять за очень короткий промежуток времени до 10^6 клеток. В течение всей процедуры клетки могут быть суспендированы в привычной для них ростовой среде в стерильных условиях. При этом отпадает необходимость осаждать их перед загрузкой в ротор; что в свою очередь позволяет избежать травмирования клеток и увеличивает их жизнеспособность. Метод требует больше мастерства и более дорогого оборудования по сравнению с другими седиментационными методами. Некоторые проблемы возникают из-за гидродинамических сил сдвига, хотя нежелательные эффекты частично пропадают при элютриации в присутствии сыворотки. Реагрегация клеток является проблемой при большинстве методов скоростной седиментации, особенно при работе с клеточными суспензиями из дезагрегированных тканей, по сравнению с разделением клеток постоянных клеточных линий. При элютриационном центрифугировании образование клеточных агре-

готов нарушает ток элютриационного буфера. Тем не менее элютриационное центрифугирование в качестве системы с высоким разрешением обеспечивает получение синхронизированной популяции минимально травмированных клеток.

Чрезвычайно эффективной альтернативой седиментационным методам разделения клеток является электронная сортировка клеток, меченных моноклональными антителами к поверхностным маркерам [гл. 6]. В качестве примера можно привести исследования Ватта с сотрудниками [11], описавших дифференциальное связывание двух моноклональных антител с кроветворными клетками. При последовательной обработке этими антителами удалось выделить с помощью проточной цитометрии популяцию клеток, на 60% обогащенную эритроидными предшественниками. Этот метод обеспечивает получение небольшого количества клеток за короткий промежуток времени по сравнению с методом элютриации. Аппаратура для сортировки клеток требует больших материальных затрат как при приобретении, так и при эксплуатации.

3. Элютриатор

В 1973 г. фирма Вескман выпустила элютриаторный ротор JE-6, и к 1980 г. эта модель была доведена до современного ротора JE-6B, устанавливаемого в стандартную центрифугу J2-21.

Полный аппарат для непрерывной проточной элютриации включает в себя ротор JE-6B, содержащий элютриаторную камеру, насос и дополнительное оборудование для загрузки/элютриации образцов клеток или для сбора вымываемых фракций.

3.1. Элютриаторный ротор

Элютриаторный ротор состоит из следующих основных частей.

- I. Черный анодированный алюминиевый корпус, содержащий центральную колонну из нержавеющей стали с апретурами входа и выхода.
- II. Камера разделения и противобалансированная обходная камера, соединенные непосредственно с центральной колонной.
- III. Вращающееся пластиковое уплотнение, обеспечивающее непрерывные вход и выход образцов и вымывающей жидкости в разделительную камеру без остановки вращения ротора.

Ротор в собранном виде со стационарными входным и выходным соединениями, установленными на вращающемся уплот-

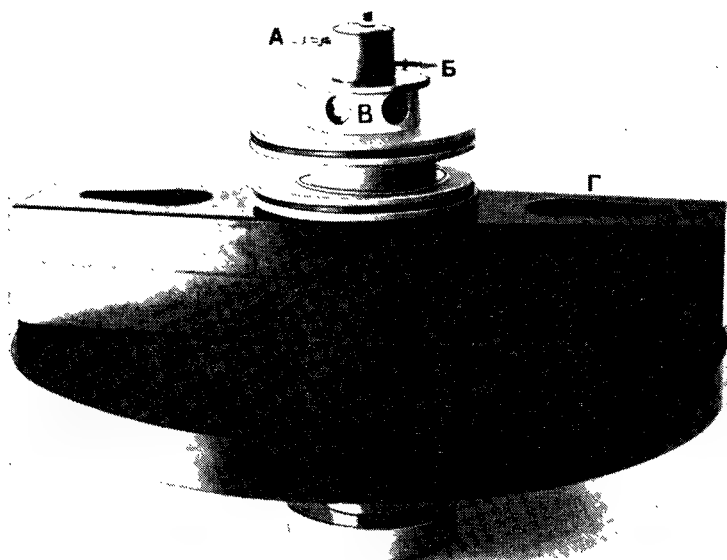


Рис. 5.1. Элютриаторный ротор. Показаны вход (А) и выход (Б) клеток, вращающееся уплотнение (В) и окно (Г) для наблюдения элютриационной камеры и ее содержимого с помощью стробоскопического источника света.

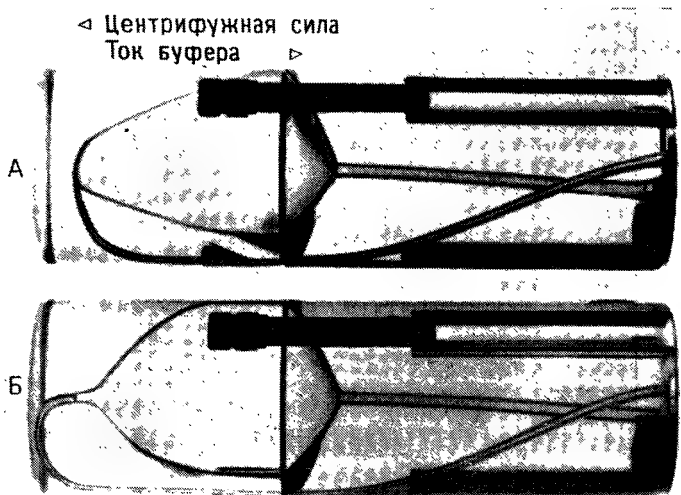


Рис. 5.2. Стандартная элютриационная камера (А) и камера Сэндersona (Б)

нением, показан на рис. 5.1. Окна в верхней и нижней частях корпуса обеспечивают наблюдение за внутренней частью камеры и ее содержимым.

3.2. Элютриационная камера

Стандартная элютриационная камера, показанная на рис. 5.2, А, изготавливается из прозрачной эпоксидной смолы. Образец или элютриационный буфер поступают со стороны основания камеры, так что ток жидкости направлен против центробежной силы. В крышку модифицированной центрифуги J2-21 вмонтировано окно, позволяющее наблюдать за камерой

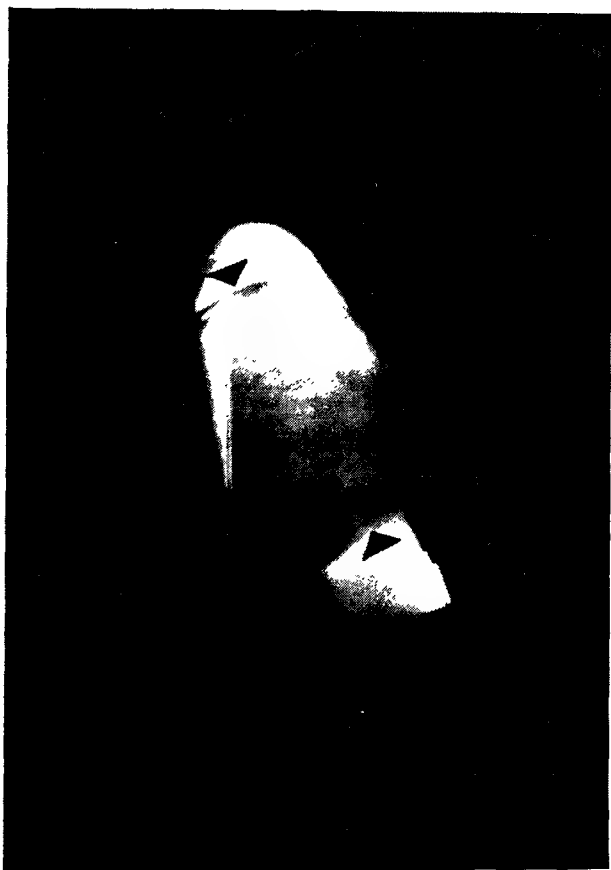


Рис. 5.3. Стандартная элютриационная камера. Вид *in situ* после загрузки образца. Стрелки указывают продвигающуюся границу клеток и вход в основании камеры.

вращающегося ротора, благодаря освещению синхронизованным стробоскопическим источником света. На рис. 5.3 показана камера, наполненная буфером, и изображение нитей стробоскопической лампы.

При загрузке камеры можно отчетливо видеть границу клеток, постепенно перемещающуюся к выходу (см. рис. 5.3). Такая картина видна при условии, что скорость седиментации клеток во вращающемся роторе точно сбалансирована скоростью тока жидкости через камеру. Дискретная клеточная граница временно исчезает, когда часть клеток удаляется в результате небольшого увеличения скорости тока. После этого граница восстанавливается и опять становится видимой, как только устанавливается равновесие между двумя противоположными силами, действующими на оставшиеся клетки (рис. 5.3).

Геометрия стандартной камеры, имеющей форму конуса, создает градиент скоростей тока от одного конца к другому. Следовательно, клетки с широким диапазоном различных скоростей седиментации могут удерживаться внутри камеры. В качестве другого варианта может быть использована камера Сэндерсона (поставляемая фирмой Beckman), в которой клетки с различной скоростью седиментации накапливаются в нижней части с резко расходящимися стенками (рис. 5.2, Б). При ступенчатом увеличении тока жидкости клетки выходят в верхнюю часть камеры, где стенки почти параллельны. Это обеспечивает лучшее разрешение и позволяет разделять клетки, минимально различающиеся по физическим свойствам. В центрипетальном конце этой камеры не видно клеточной границы. Другим отличием от стандартной камеры является конструкция входа у основания. В камеру Сэндерсона клетки и элютриационный раствор входят снизу, а не сбоку, как в стандартной камере. Это предотвращает агрегацию клеток.

3.3. Перистальтический насос и дополнительная аппаратура

Для прокачивания элютриационного буфера требуется перистальтический насос с переменной скоростью, регулируемой микрометрическим контрольным устройством. Насос по возможности должен быть снабжен устройством для автоматической компенсации изменения нагрузки и обеспечивать линейную зависимость между положениями потенциометра контроля скорости насоса и реальной скоростью тока жидкости в диапазоне от 10 до 60 мл/мин. Этим требованиям удовлетворяют насосы Watson-Marlow 501 и Cole Parmer Masterflex 7520.

Насос переносит клеточную суспензию или буфер для элютриации из контейнеров при постоянной температуре в водяной

или ледяной бане. Каждый контейнер соединен с атмосферой через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore или Gelman), и его соединение с насосом осуществляется силиконовыми трубками (внутренний диаметр 0,06—0,12 дюйма, толщина стенки 0,6 дюйма; Cole Parmer) и тефлоновым вентилем, как показано на рис. 5.4. Насос соединен также с входным устройством ротора через манометр, показывающий любую закупорку трассы, и ловушку для пузырьков, которая собирает образующиеся в жидкости пузырьки и предотвращает их попадание в

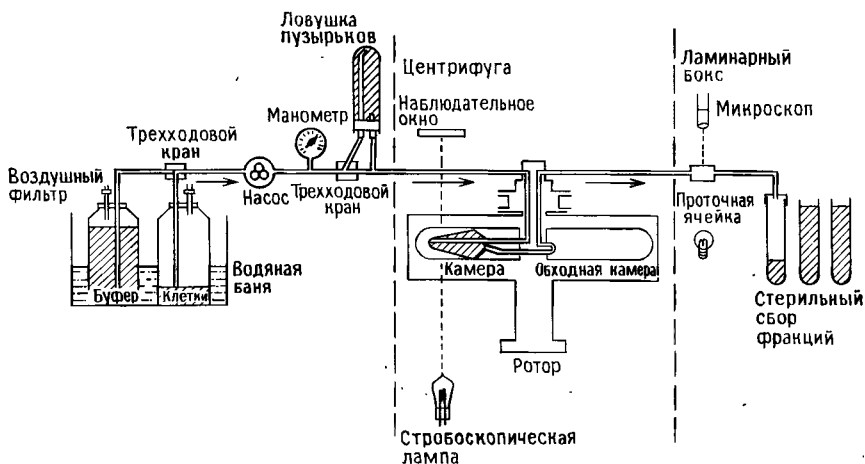


Рис. 5.4. Диаграмма, представляющая полную установку для элютиации.

камеру, где они могут разрушать суспендированные клетки. Выходное устройство ротора через проточную ячейку (Starna) соединено с устройством для стерильного отбора проб, размещенным в ламинарном боксе. Проточная ячейка обеспечивает регистрацию прохождения клеток с помощью микроскопа с малым увеличением или по поглощению при 660 нм. Это позволяет выборочно отбирать пробы, содержащие клетки, что обеспечивает сбор фракций в минимальном объеме.

3.4. Полная система элютиации

Взаиморасположение ротора и вспомогательных устройств может изменяться в зависимости от условий эксперимента. Можно, например, собрать систему, расположив насос на выходной линии ротора. Такое расположение позволяет снижать турбулентность потока у основания разделительной камеры. При другой системе расположения контейнер с клетками устанавливается между насосом и входным устройством

ротора. При этом предотвращается прохождение клеток через головку насоса. Практика показывает, однако, что, судя по результатам определения жизнеспособности, прохождение клеток через колонку насоса не сопровождается их повреждением.

Когда клетки откачиваются из резервуара, как показано на рис. 5.4, тангенциально действующие силы Кориолиса влияют на небольшое начальное количество клеток в камере, вызывая неупорядоченную элютриацию клеток всех размеров [10]. В качестве альтернативы используется инъекция шприцем концентрированной клеточной суспензии в среду для элютриации непосредственно перед входом в ротор. Попадание в камеру такого большого образца клеток приводит к установлению равновесия инерциальных и гидродинамических сил.

4. Технический протокол

4.1. Стерилизация аппаратуры

Элютриация может проводиться без стерилизации аппаратуры, если не требуется последующее культивирование полученных клеточных фракций. В противном случае должны быть проведены следующие операции. До сбора аппаратуры следует проавтоклавировать все соединительные трубки и узлы, предназначенные для соединения резервуаров с буферами и образцами клеток и для сбора клеточных фракций.

Производители приборов рекомендуют стерилизацию полностью собранных аппаратов путем прокачивания 6%-ного раствора перекиси водорода. Можно использовать также 0,2%-ный раствор диэтилпиروкарбоната или Цидекс (Arbrook, Livingstone, UK). В ряде случаев можно проводить автоклавирование (121°C в течение 1 ч) всего ротора в сборе, за исключением сальника разделительной камеры. Виниловый сальник следует стерилизовать отдельно в 6%-ной перекиси водорода. Дезинфекция аппарата путем прокачивания этанола через систему при включенных цепях центрифуги нежелательна вследствие опасности возгорания из-за поврежденных или искрящих электрических контактов.

- I. Соберите аппаратуру, как показано на рис. 5.4, но емкости с буфером и образцом клеток замените на емкости с 200 мл Цидекса в каждой.
- II. При неподвижном роторе включите насос и установите подачу стерилизующего агента в систему со скоростью 40 мл/мин. Переключайте трехходовые краны для заполнения всех соединительных трубок и емкостей.
- III. Отверните манометр для удаления воздуха из его шейки и затем верните его в нужное положение.

- IV. Отделите ловушку пузырьков и освободите ее от воздуха, опуская постепенно маленькую иглу до нижнего уровня сосуда. Установите ловушку пузырьков, как показано на рис. 5.4.
- V. Для удаления воздуха из ротора включите центрифугу и доведите скорость вращения ротора до 1000 об/мин. Отключите насос и затем выключите центрифугу. Вновь включите насос, когда скорость вращения ротора станет ниже 500 об/мин. Пузырьки воздуха должны выйти из ротора. Повторяйте процедуру, пока пузырьки не перестанут выходить. Давление на манометре должно быть ниже 10 фунт/дюйм² (1,67 бар).
- VI. Выключите ротор и насос и оставьте Цидекс в системе на ночь.
- VII. После стерилизации пережмите обе трубки для поступления жидкости и подсоедините их в асептических условиях к сосудам, содержащим по 1000 мл стерилизованной дистиллированной воды каждый. Снимите зажимы.
- VIII. Прокачайте воду через систему и соберите Цидекс для повторного использования.

4.2. Калибровка скорости тока

- I. Включите центрифугу и разгоните ротор до 2000 об/мин.
- II. После стабилизации скорости ротора включите стробоскопический контроль и подрегулируйте частоту вспышек так, чтобы разделительная камера «остановилась» и была бы ясно видна через смотровое окно.
- III. На основании показаний стробоскопического счетчика определите точную скорость ротора.
- IV. Установите потенциометр насоса на произвольную (низкую) скорость и определите скорость тока, собирая оттекающую жидкость в мерный цилиндр в течение 2 мин.
- V. Постепенно повышайте положение потенциометра и на основе полученных данных постройте для микропроцессора график или программу зависимости между положением потенциометра и скоростью тока жидкости.

4.3. Загрузка образца

- I. Используя в случае необходимости стерильную технику, пережмите входной соединительный шланг и отделите его от дистиллированной воды, соблюдая предосторожности от попадания в систему воздуха.
- II. Подсоедините входные трубки к контейнерам с буфером для элютирования объемом 1 л и 100 мл. В качестве такого буфера можно использовать сбалансированные солевые

растворы, если не предполагается культивировать получаемые элютриацией клетки. Больше всего для элютриации подходит полная ростовая среда, которая затем может быть использована для повторного культивирования. Среду следует держать в водяной бане при 37°C , как показано на рис. 5.4.

- III. Снимите зажимы и, правильно установив трехходовой кран, как можно полнее засосите во входные трубки порцию среды в 100 мл. Этот буфер заместит воду в переходных трубках. Переключите трехходовой кран для прокачивания через систему буфера из литрового контейнера до полного вытеснения воды из системы. Сохраните большую часть литрового образца в качестве буфера для элютриации.
- IV. Пережмите входную трубку и перенесите ее с контейнера с порцией 100 мл на контейнер с образцом клеток, как показано на рис. 5.4. Снимите зажим. Подходящим образцом может быть 200 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^8$ клеток в полной среде.
- V. Установите скорость протока жидкости 12 мл/мин и доведите скорость вращения ротора до 2000 об/мин. Переключите трехходовой кран для всасывания клеток в разделительную камеру. Эти условия обеспечат удержание в камере всех частиц с диаметром выше 8 мкм. Если в этих условиях в образце будут эритроциты, они немедленно пройдут через камеру в собирательные сосуды.
- VI. После загрузки более 95% объема клеток переключите трехходовой кран в такое положение, чтобы опять подключить к системе буфер для элютриации. Когда затем все клетки пройдут через ловушку пузырьков, переключите местный трехходовой кран для отключения ловушки от системы.

4.4. Элютриация дискретных клеточных популяций

Существуют два метода изменения равновесия двух противоположно направленных факторов (скорости седиментации в поле центробежных сил и скорости тока жидкости), действующих на клетки, суспендированные в разделительной камере. Можно либо снизить скорость центрифугирования, либо увеличить скорость протока.

Хотя в центрифуге J2-21 возможна модификация стандартного потенциометра контроля скорости, обеспечивающая точную регулировку, торможение ротора может приводить к снижению скорости ниже установленного уровня. Кроме того, при каждом новом установленном значении скорости для отбора дискретной фракции клеток следует проводить регулировку

стробоскопа, чтобы камера опять стала видимой. Поэтому на практике лучше оставлять скорость вращения ротора постоянной и варьировать скорость потока.

- I. С помощью регулятора насоса увеличьте скорость тока жидкости примерно на 5 мл/мин. Точное значение, необходимое для отмучивания специфической фракции клеток, в первом приближении подбирается эмпирически. Приблизительные значения могут быть получены из выражения

$$F = XD^2 \left(\frac{\text{RPM}}{1000} \right)^2$$

где F — скорость тока жидкости в мл/мин, X —0,0511 (стандартная камера) или 0,0378 (камера Сэндерсона), D — диаметр клетки в мкм и RPM — скорость вращения ротора в об/мин.

Это уравнение отражает условия на границе элютриации клеток и используется в руководстве Beckman для построения номограммы, связывающей скорость тока, размер клетки и скорость вращения ротора. Эти же данные могут быть модифицированы с использованием программы микропроцессора путем включения фактора корреляции, полученного из соотношения между вычисленным и действительным размером клеток, разделяющихся при данной комбинации скорости тока жидкости и скорости вращения ротора.

- II. Следите за границей клеток, передвигающейся центостремительно в разделительной камере, и за прохождением клеток через проточную ячейку. Используя при необходимости стерильные условия, собирайте клеточные фракции. Для сбора всех клеточных фракций требуется ~150 мл буфера для элютриации.
- III. Когда граница клеток опять становится видимой в разделительной камере и проточная ячейка освобождается от клеток, вновь проведите ступенчатое повышение скорости потока и соберите следующую фракцию разделенных клеток, как описано выше.

Элютриация специфической фракции клеток при заданных скорости жидкости и скорости вращения ротора оказывается воспроизводимой при условии, что разделение проводится с использованием одного и того же буфера, при той же температуре и при той же начальной концентрации клеток в камере. Постоянная скорость вращения ротора и скорость потока могут сочетаться со ступенчатым увеличением плотности элютриационной среды для увеличения разрешения фракционирования. Обратите внимание на то, что все содержимое камеры может быть откачено, если отключить ротор от системы. Это может

оказаться удобным, если производится концентрирование какого-либо специфического типа клеток в камере, например клеток белого ряда цельной крови. Прекращение прокачивания приводит к преципитации клеток в камере.

5. Сбор клеток и интерпретация данных

Информация, получаемая из опытов по элютриации, зависит от того, использовалась ли в качестве начального образца гетерогенная или однородная популяция клеток.

5.1. Гетерогенные клеточные популяции (достижение чистоты клеточных фракций)

Целью эксперимента по элютриации в этих случаях является обычно разделение и сбор различных типов клеток. Например, нормальные клетки хозяина могут быть отделены от опухолевых клеток. Анализ типа (типов) клеток, присутствующих в каждой фракции, может быть достигнут классическими цитологическими методами (фиксация и окрашивание). Результаты морфологических исследований показывают степень целостности клеток, особенно при использовании механической или ферментативной дезагрегации органа или солидной опухоли для получения начальной суспензии клеток. (см. гл. 1 и 6). Обогащение клеточных фракций может быть далее оценено измерением размера клеток в анализаторе размера частиц Каултер биохимическими методами, культивированием в мягком агаре или другими испытаниями колониеобразования *in vitro*, анализом способности клеточных фракций к образованию колоний *in vivo*.

Примером простого разделения клеток из смеси может служить элютриация эритроцитов птиц и эритролейкозных клеток мыши. Эритроциты отделяются при условиях, используемых для загрузки смешанной клеточной популяции (2000 об/мин, скорость тока 14 мл/мин). Более крупные опухолевые клетки удерживаются в камере и отделяются позднее (2000 об/мин, скорость тока 25 мл/мин). Начальная смешанная популяция, состоящая на 55% из эритроцитов и на 45% из опухолевых клеток, при элютриации дает две фракции, первая из которых более чем на 99% состоит из эритроцитов, а вторая более чем на 97% — из эритролейкозных клеток.

5.2. Постоянные линии клеток (выход и жизнеспособность)

Другие процедуры требуются при классификации клеток, разделяемых из постоянных клеточных линий, состоящих из однородных клеток. Элютриационным центрифугированием

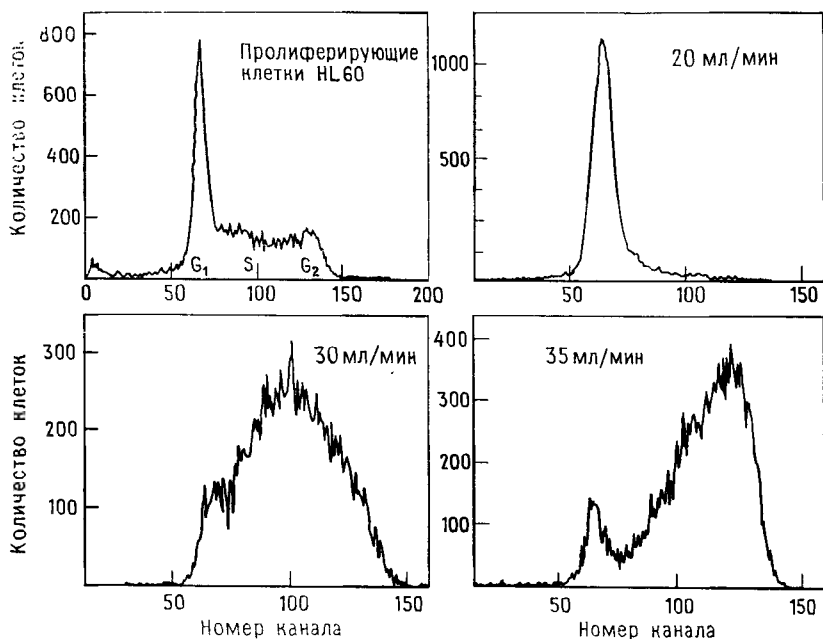


Рис. 5.5. Кривые проточной цитометрии клеток HL60. На первом рисунке показана кривая для асинхронно делящихся клеток, а на последующих — кривые для различных фракций, выделенных при указанных скоростях потока.

можно получить фракцию клеток, находящихся в определенных фазах клеточного цикла, что трудно сделать на основе чисто морфологических методов.

Чтобы отличить клетки в S-фазе от клеток, находящихся в других фазах цикла, можно использовать включение тимидина, меченного тритием, в ДНК с последующим выявлением изотопа (радиоавтографией или с помощью сцинтилляционного счетчика). Однако в настоящее время наиболее точный и полный анализ разделяемых клеток может быть проведен с помощью проточной цитометрии (см. гл. 6).

Ниже приведены два примера, иллюстрирующие разрешение метода и жизнеспособность разделенных клеток.

5.2.1. Клетки HL60

Профиль проточной цитометрии для асинхронно делящихся клеток HL60 приведен на рис. 5.5. Этот профиль типичен для постоянных линий клеток, хотя клетки HL60 гетерогенны по содержанию ДНК. $2 \cdot 10^8$ таких клеток были загружены в ро-

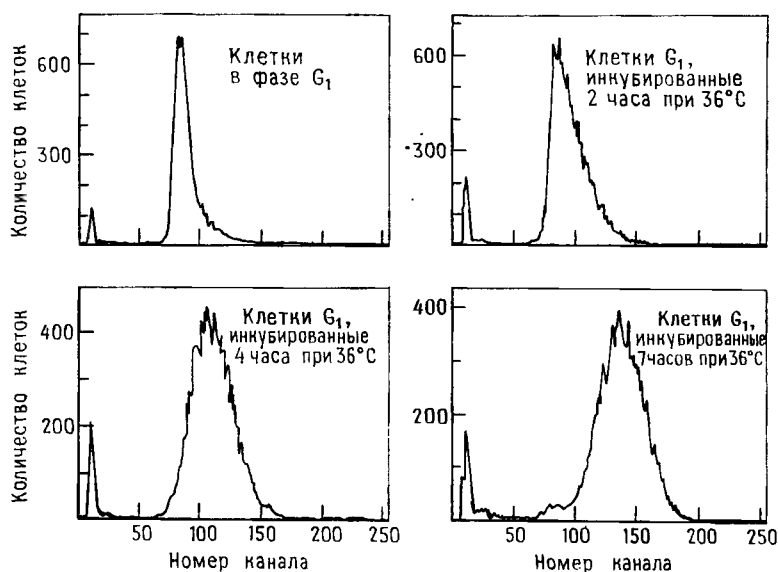


Рис. 5.6. Кривые проточной цитометрии эритролейкозных клеток в фазе-G₁ и тех же клеток, культивированных в течение указанного времени. Маленький пик в нескольких первых каналах представляет эритроциты птиц, добавленные в качестве маркера, от которого можно отмерять расстояние до пика G₁. Пик G₂ находится на двойном расстоянии.

тор, вращающийся со скоростью 2000 об/мин при скорости потока 15 мл/мин. В качестве буфера для элютриации была выбрана полная среда RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки при 20°C. При скорости потока 20 мл/мин была получена фракция клеток, находящихся по данным проточной цитометрии в фазе G₁. При скорости потока 25 мл/мин отбиралась популяция, содержащая клетки фазы G₁ и ранней фазы S (не показано). При скорости потока 30 мл/мин отбиралась чистая популяция клеток, находящихся в середине S-фазы, а при скорости 35 мл/мин — клетки в поздней S-фазе и в фазе G₂ с небольшой примесью клеток из фазы G₁. Общий выход клеток, как правило, превышал 80%, и в разделительной камере оставались агрегаты клеток всех фаз клеточного цикла.

5.2.2. Эритролейкозные клетки

Для оценки жизнеспособности разделяемые эритролейкозные клетки в фазе G₁ могут быть культивированы в элютриационном буфере (полная среда) при 37,5°C. Через различное время культивирования отбираются пробы для анализа в проточном цитометре. Получаемые профили (рис. 5.6) свидетель-

ствуют о синхронном прохождении клетками клеточного цикла между 2 и 7 ч. Прохождение цикла заканчивается к 12 ч (времени одного цикла), когда клетки повторно входят в фазу G1 (не показано).

Таким образом, элютриационное центрифугирование представляет собой процедуру, обеспечивающую получение минимально травмированной синхронной популяции клеток при небольших значениях сил тяжести. Метод позволяет избежать повреждения клеток при их осаждении и осмотических эффектов центрифугирования в градиенте плотности. При загрузке в ротор до 10^9 клеток можно провести разделение за относительно короткое время.

6. Дальнейшие перспективы

При использовании стандартной камеры общий выход специфических типов клеток после загрузки 10^9 клеток не всегда оказывается адекватным. Постепенная загрузка увеличивает не только выход клеток, но и продолжительность разделения. Иногда обходная камера заменяется на вторую разделительную, устанавливаемую последовательно, однако это не дает реального преимущества по сравнению с двумя последовательными циклами элютриации в одной разделительной камере. Использование системы двойных камер, действующих параллельно, требует существенной модификации конструкции ротора, которая, впрочем, не ограничивает число разделительных камер двумя.

В последнее время удалось резко увеличить возможности разделения большого количества клеток при сохранении чистоты фракций [12]. Новый ротор-элютриатор большой емкости JE-10X, выпускаемый фирмой Beckman, имеет камеру с 10-кратно увеличенным объемом. Результаты предварительных исследований показывают, что при центрифугировании в этом роторе сохраняется чистота выделяемых фракций и достигается 10-кратное увеличение выхода клеток.

7. Благодарности

Экспериментальные исследования проведены благодаря субсидии, полученной от Центра по изучению рака.

Литература

1. Lindahl P. E. (1948). *Nature*, **161**, 648.
2. Lindahl P. E. (1960). *Cancer Res.*, **20**, 841.
3. McEvan C. R., Stallard R. W., Jukos E. T. (1968). *Anal. Biochem.*, **23**, 369.

4. Pretlow T. G., Weir E. E., Zettergren J. G. (1975). *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **14**, 91.
5. Pretlow T. G., Pretlow T. P. (1982). In: *Cell Separation*, Vol. 1, Pretlow T. G., Pretlow T. P. (eds.), Academic Press, London and NY, p. 41.
6. Nijhof W., Wierenga P. K. (1982). *Exp. Haematol.*, **10**, Suppl. 12, 307.
7. Miller R. G., Phillips R. A. (1969). *J. Cell Physiol.*, **73**, 191.
8. Miller R. G. (1973). In: *New Techniques in Biophysics and Cell Biology*, Vol. 1, Pain R. H., Smith B. J. (eds.), Wiley, NY, p. 87.
9. Wells J. R. (1982). In: *Cell Separation*, Vol. 1, Pretlow T. G., Pretlow T. P. (eds.), Academic Press, London and NY, p. 169.
10. Sanderson R. J., Bird K. E., Palmer N. F., Brenman J. (1976). *Anal. Biochem.*, **71**, 615.
11. Watt S. M., Metcalf D., Gilmore D. J., Stenning G. M., Clark M. R., Waldmann H. (1983). *Mol. Biol. Med.*, **1**, 95.
12. Jemionek J. F. (1981). *Transfusion*, **21**, 268.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

Л. Мораска и Э. Эрба

1. Введение

Проточная цитометрия — это относительно новый метод, позволяющий оценивать несколько оптических параметров для каждой частицы в суспензии, например оптическую плотность, флуоресценцию и светорассеяние; определять их можно как поодиночке, так и все сразу. Каждое измерение проводится за несколько микросекунд; это обеспечивает сбор данных на большой популяции частиц. Возможность анализа оптических параметров частиц позволяет осуществлять их сортировку в сложных смесях по одному или более измеряемым параметрам. Методом сортировки можно характеризовать клеточную популяцию по светорассеянию — одному из параметров, дающему информацию об объеме или площади поверхности клеток. Два других обычно оцениваемых параметра — это оптическая плотность и флуоресценция.

Кроме сортировки клеток, функции более или менее уникальной для приборов этого типа, проточная цитометрия имеет значительные преимущества перед обычными микрофлуориметрией и микроденситометрией. Главным преимуществом является способность сканировать большие популяции за меньшее время по сравнению с обычными микрометодами благодаря возбуждению флуорохромов светом в течение короткого и постоянного промежутка времени. Это обеспечивает более точное и надежное измерение флуоресцентного излучения. Однако проточная цитометрия не может быть использована для анализа клеточной структуры и морфологии прикрепленных клеток, тогда как микрофлуориметрия и микроденситометрия специально предназначены для решения этих задач.

Анализ клеток проточной цитометрией в жидкой среде требует совершенно иных методов окрашивания по сравнению с окраской клеток на стеклах. Суспензия должна состоять из одиночных клеток, флуоресцентные зонды или другие красители должны быть специфичны и не вымываться из клеток в среду, флуоресцирующие красители должны возбуждаться какой-либо из линий аргонного или криптонового лазера, и в том случае, когда предполагается сортировка жизнеспособных клеток, краситель не должен быть токсичным.

В некоторых упрощенных установках более дорогие лазеры заменяются дуговыми лампами. Однако, несмотря на большее число спектральных линий, эти установки с дуговым освещением оказываются менее чувствительными. Размер компьютера и программное обеспечение являются другими факторами, ограничивающими применение проточных цитометров. Следует подчеркнуть, что нужно тщательно продумывать список комплектующего оборудования. Кроме цены выбор того или иного набора оборудования определяет пригодность установки к проведению определенного типа анализа или сортировки. Некоторые установки могут быть прекрасно приспособлены для многопараметрического анализа, но непригодны для сортировки клеток и наоборот.

2. Сборка оборудования

Установка состоит из следующих частей.

- а) Система протока, обеспечивающая поддержание постоянной скорости движения одиночной клетки в пучке возбуждающего света, фокусируемого конденсорными линзами.
- б) Оптическая система, выполняющая следующие функции:
I. формирование пучка возбуждающего света диаметром несколько микрон в участке прохождения клетки;
II. измерение потери света, обусловленной прохождением каждой клетки через световой пучок, рассеяния света под малым углом и в ряде случаев спектральных характеристик рассеянного света;
III. оптическая система должна улавливать рассеянный свет и спектральные характеристики флуоресценции, излучаемой клетками под углом 90° к возбуждающему световому пучку.
- в) Быстродействующая аналоговая система усиления и анализа сигнала.
- г) Аналого-цифровой преобразователь, способный переносить поток данных в память многоканального анализатора или компьютера.
- д) Программируемый компьютер, обеспечивающий обработку данных.
- е) Источник света, способный возбуждать флуоресценцию одиночных клеток с достаточно высокой плотностью энергии.
- ж) В оборудовании, предназначенном для сортировки клеток, измерения, проводимые в реальном времени, могут быть отобраны пороговой системой, способной включать устройство, заряжающее часть текущей жидкости с выбранной клеткой положительным или отрицательным зарядом.

дом, благодаря которому каждая капля после образования будет отклоняться в предназначенный для нее контейнер. Поэтому оказывается возможным выбирать из потока два различных типа клеток, направляя их к положительно или отрицательно заряженным участкам сбора.

Несколько компаний участвуют в настоящее время в производстве такого оборудования, которое можно разделить на две главные группы: аналитические устройства, предназначенные для измерения рассеяния, поглощения и флуоресценции, и клеточные сортеры, предназначенные для разделения клеток по определенным свойствам.

Среди аналитических устройств простейшими являются машины с дуговыми лампами возбуждающего света, такие, например, как ICP22 и FACS Analyzer. Более сложные приборы дороги и характеризуются ограниченным числом полос возбуждения газовых лазеров, но они обладают высокоэнергетическими характеристиками источников света и, следовательно, вызывают более интенсивное флуоресцентное излучение используемых флуорохромов.

Все клеточные сортеры включают в себя один или два лазера для возбуждения и более сложные компьютерные устройства. Конструкции установок, поставляемых разными компаниями, существенно отличаются по устройству проточной камеры, предназначенной для эффективной аналитической системы, жесткой, но легко управляемой (к таким машинам относятся 3Q50 и Spectrum, выпускаемые фирмой Ortho), или для более эффективного сортирования (наиболее широко известными машинами этого типа являются установки серии FACS фирмы Becton Dickinson). В создание и выпуск установок сходного типа вовлечены сейчас и другие компании, такие как Coulter и Partec. Каждая компания может предложить эффективную установку, отвечающую определенным требованиям, и в большинстве случаев точная формулировка этих требований однозначно определяет выбор машины.

2.1. Ortho Diagnostic Systems Inc.

Ортоцитофлуорограф IIS (Ortho Cytofluorograf¹⁾)

Цитофлуорограф IIS (рис. 6.1—6.3) состоит из четырех модулей.

2.1.1. Двухлазерный измерительный блок, модель FC210

Модель FC210 включает в себя два лазера, четыре детектора с предусилителями и регулировкой усиления, проточную

¹⁾ Торговая марка.

ячейку, оптические фильтры, линзы и систему подачи образцов.

Лазеры. В стандартный комплект обычно входят 5-Вт аргоновый лазер и гелий-неоновый лазер со сверхнизким шумом, мощностью 0,8 мВт. Аргоновый лазер используется главным образом для возбуждения флуоресценции, но может быть также использован для измерений светорассеяния. Он обладает

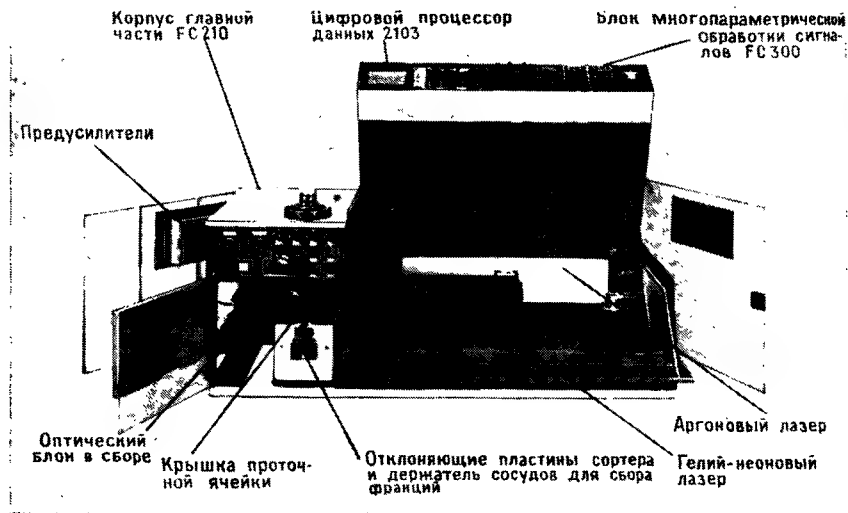


Рис. 6.1. Цитофлуорограф системы 50Н с открытыми дверцами.

непрерывной регулировкой мощности и максимумами излучения при следующих длинах волн: 488; 514,5; 501,7; 457,9; 496,5; 418 и 351,1 нм.

Гелий-неоновый лазер используется для измерений с высоким разрешением поглощения света, а также рассеяния под малыми и широкими углами. Эти возможности обеспечивают измерение размеров клеток, использование нефлуоресцирующих красителей и разделение клеток, основанное на различиях в коэффициенте преломления и гранулярности.

Аргоновый лазер мощностью 5 Вт может быть заменен на более дешевый аргоновый лазер мощностью 100 мВт.

Детекторы. Все детекторы, за исключением детектора поглощения света, использующего твердофазный сенсор, представляют ультраширокополосные высокочувствительные фотоэлектронные умножители (ФЭУ). Могут также поставляться четыре дополнительных детекторных ФЭУ. Каждый ФЭУ в сборе содержит фотоэмиссионный диод для калибровки. Вертикальная оптическая система фильтров обеспечивает выбор длины вол-

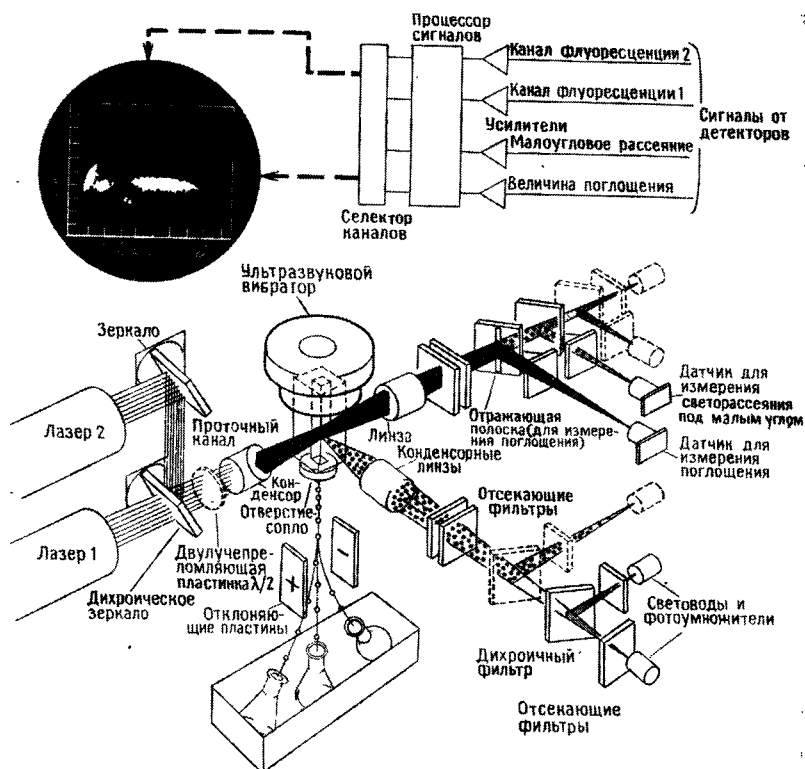


Рис. 6.2. Оптическая схема FC210. Обозначения: диагонально расположенные элементы — дихроические фильтры; перпендикулярно расположенные элементы — фильтры длин волн, поляризационные и т. д.; пунктиром обозначены дополнительные элементы.

ны света, к которой чувствителен детектор, и определение угла сбора света. Применяемая оптика обеспечивает сбор как флуоресцентного излучения, так и рассеянного возбуждающего света. В результате эта система может использовать как флуоресцирующие, так и нефлуоресцирующие красители.

В целом оптическая система располагает семью положениями детекторов. Использование волоконных оптических элементов для передачи оптических сигналов на детекторные ФЭУ значительно увеличивает универсальность и простоту использования системы.

Проточная ячейка. Проточная ячейка изготовлена из кварца и имеет плоские поверхности снаружи и внутри. Лазерные лучи пересекают образцы, протекающие внутри ячейки (не на воздухе).

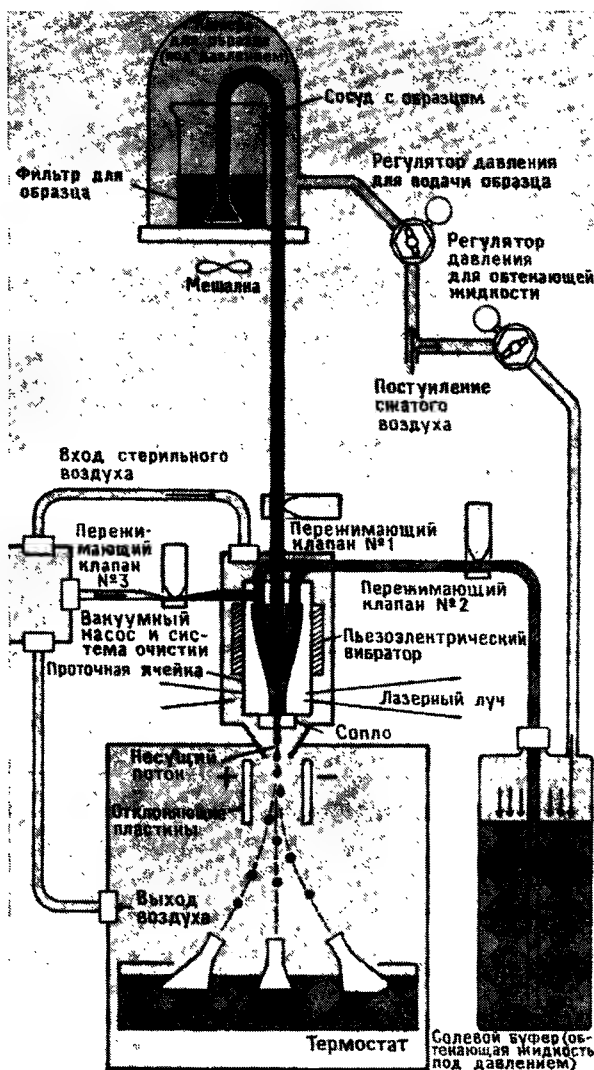


Рис. 6.3. Схема тока жидкости в приборе FC210 модель 50.

Подача образцов. Система подачи образцов содержит чувствительное к объему устройство для измерения концентрации клеток, встроенный фильтр одноразового пользования для задержки клеточных агрегатов и вакуумный вытеснитель. Камера входа образца приспособлена для соединения с сосудом

с клеточной суспензией объемом до 30 мл. Все части, имеющие контакт с анализируемым образцом, могут легко сниматься для стерилизации.

2.1.2. Цифровой процессор данных, модель 2103

Процессор 2103 представляет собой многократный анализатор, который воспринимает, хранит и выводит на дисплей две однопараметрические гистограммы данных, цитограммы (двухпараметрический точечный график на встроенный запоминающий осциллограф) и включает периферическое оборудование для накопления данных.

2.1.3. Многопараметрический процессор сигнелов, модель FC300

Среди многих полезных операций, осуществляемых FC300, отметим следующие:

- а) Выбор сигналов из четырех детекторов для вывода на оси X и Y цитограммы.
- б) Выбор способа анализа сигнала детектора, измерение высоты, площади (или ширины) пика.
- в) Выбор логарифмической или линейной шкалы по осям X и Y.
- г) Определение двух интересующих участков на цитограмме для дифференциального просчета и для сортировки. Эти участки могут быть любой формы, ограниченной двумя парами параллельных линий.

Субпопуляция для сортировки может определяться по размеру и флуоресценции, как, например:

- д) Установление интервала для выравнивания смещения двух лазерных лучей вдоль тока клеток.
- е) Наблюдение импульсов детектора в зависимости от времени.
- ж) Снабжение задней панели коннекторами с временем задержки 45 или 120 мкс для всех поступающих сигналов, сопровождающихся специальными импульсами для удобного перевода в лабораторный компьютер.

2.1.4. Модуль клеточного сортере, модель FC400

Этот модуль обеспечивает физическое разделение субпопуляций клеток в отдельные сборные сосуды.

Тумблер «Отброс совпадений» может быть установлен в положения «Включено» и «Выключено». При положении «Включено» отобранные клетки будут собираться только в том случае, если нет примеси клеток с другими параметрами. Такой режим устанавливается, когда требуется высокая чистота от-

бираемых клеток (95% или выше). При установке тумблера в положение «Выключено» отобранные клетки будут собираться независимо от того, содержатся ли в этой фракции примесные клетки. Такой режим используется, когда требуется максимальный выход клеток, например когда эти клетки редко встречаются в популяции.

На передней панели FC400 установлено несколько контрольных тумблеров. Они обеспечивают выбор числа капель при работе в режиме антисовпадений независимо от числа капель, отклоняющихся на тип команды, и выбор клеток внутри и вне выбранного для сбора интервала. Предусмотрена также временная задержка между выдачей сигнала и ответом.

Имеется также тест-система, позволяющая видеть центральный, левый и правый токи капель. Эта система позволяет проверять стабильность сортера.

Размер и частота образующихся капель определяются главным образом размером отверстия, установленного на выходе проточной ячейки. Поставляются ячейки с отверстиями трех различных диаметров: 50, 75 и 100 мкм.

Прибор снабжен устройством для счета клеток. При включенном устройстве прибор автоматически останавливается, когда будет набрано заданное количество клеток. О работе этого устройства свидетельствует горящая сигнальная лампочка. Устройство может быть отключено, и при определенном положении тумблера сортировка клеток продолжается без автоматической остановки.

2.2. Клеточный сортер с активируемой флуоресценцией FACS 440 фирмы Becton Dickinson

2.2.1. Регистрация клеток

Как и в системе Ortho, сигналы светорассеяния и флуоресценции поступают от клеток, когда они пересекают лазерный луч высокой интенсивности (рис. 6.4). Они освещаются ультрафиолетовым аргоновым лазером мощностью 2 или 5 Вт, имеющим первичные эмиссии 800 мВт при длине волны 514,5 нм и 700 мВт — при 488 нм, а также вторичные эмиссии при 501,7; 457,9; 418 и 351,1 нм.

Главное отличие между системами FACS и Ortho Cytofluorograf заключается в том, что освещение образца в системе FACS происходит в свободно текущем потоке жидкости вне выравнивающей клетки камеры в отличие от анализа внутри проточной ячейки в системе Ortho. Рассеянный свет регистрируется твердофазным детектором со спектральной чувствительностью от 330 до 1100 нм. Апертурная диафрагма ирисного типа позволяет регистрировать рассеяние под малыми углами

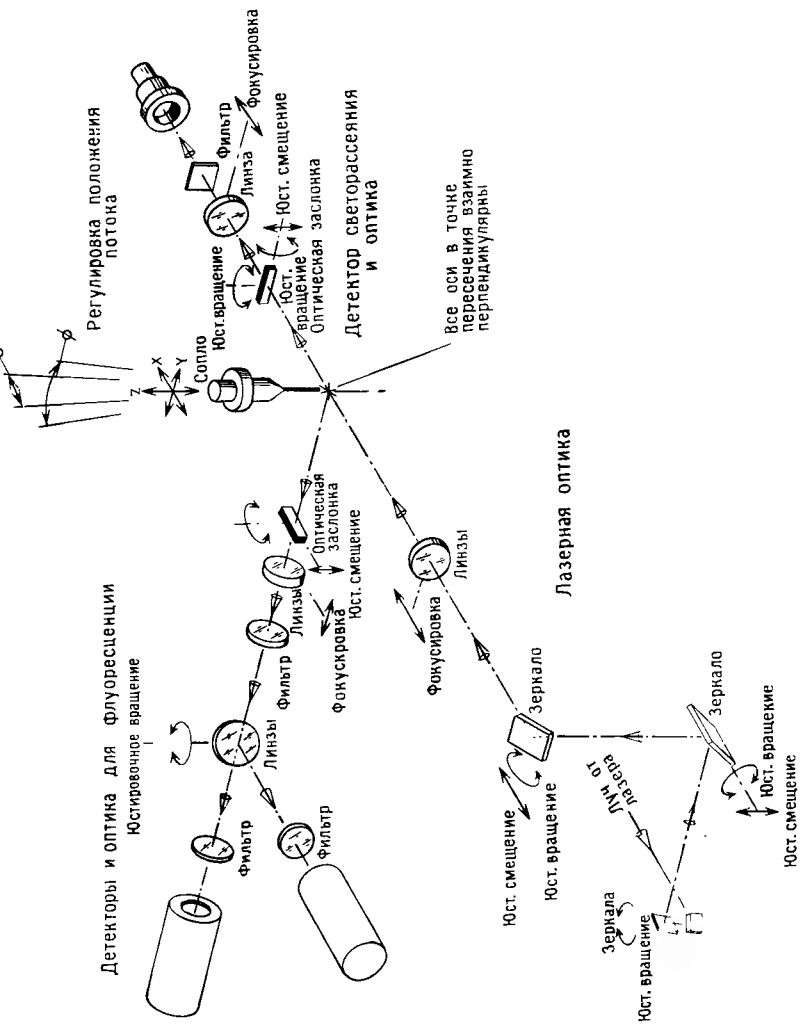


Рис. 6.4. Прибор FACS440. Оптические и механические юстировки блока регистрации.

(от 1 до $1,5^\circ$) и широкоугловое рассеяние ($1-15^\circ$). Детектор рассеянного света способен различать клетки по размерам от 0,3 мкм до предела апертуры используемого отверстия.

Флуоресцентное излучение (350—600 нм) предварительно окрашенных клеток регистрируется многоэлектродными ФЭУ. Эмиссия специфических красителей отбирается с помощью фильтров и зеркала, расщепляющего луч.

Оцениваемая нижняя граница чувствительности детекторов флуоресценции составляет 2000 эквивалентов молекул ФИТЦ на клетку.

При использовании в каналах флуоресцентного света поляризационных фильтров в качестве анализаторов можно провести определение вертикального и горизонтального компонентов поляризации флуоресценции. Выпускается также FACS440 с двухлазерной оптической скамьей. Эта модификация позволяет одновременное использование двух лазерных лучей для двойного рассеяния и тройного возбуждения флуоресценции и сортировки. В этом случае требуется добавление третьего канала регистрации флуоресценции.

При использовании этой двухлазерной установки можно, например, применять освещение с длинами волн 488 и 600 нм для последовательного возбуждения флуоресцеина, фикоэритрина и техасского красного. Два независимых луча пересекают поток клеток в вертикально отстоящих друг от друга точках, так что клетка вначале пересекает луч с длиной волны 488 нм, а затем — с длиной волны 600 нм. Каждая клетка генерирует при этом три флуоресцентных сигнала, два в первом луче и один во втором. Сигналы, индуцируемые двумя лазерами, разделены в пространстве и во времени, и промежуток между ними равен тому времени, которое необходимо клетке, чтобы пройти от первого участка пересечения лазерного луча с потоком до второго. Этот промежуток времени позволяет электронике проводить раздельный анализ сигналов. Пространственное разобшение обеспечивает регистрацию сигнала каждым детектором с оптимальным соотношением сигнал/шум.

2.2.2. Сортировка клеток

Условия сортировок определяются главным образом выбором верхнего и нижнего порогов для светорассеяния и эмиссии флуоресценции вместе или по отдельности. В установке имеются две пробирки для сбора фракций (рис. 6.5), что позволяет проводить одновременную сортировку клеток по двум параметрам. Остальные клетки собираются в центральный резервуар.

Камера для анализируемого образца содержит 5 мл жидкости с концентрацией клеток до $5 \cdot 10^6$ клеток/мл. Для более

концентрированных суспензий (когда прибор используется как средство обогащения суспензии клетками нужного типа) необходимо лишь, чтобы концентрация клеток, предназначенных к отбору, не превышала $5 \cdot 10^6$ на 1 мл. Существенно также, чтобы детектируемые сигналы, на которых основан критерий отбора, превышали фоновые сигналы от клеток, отбрасываемых в ходе сортировки.

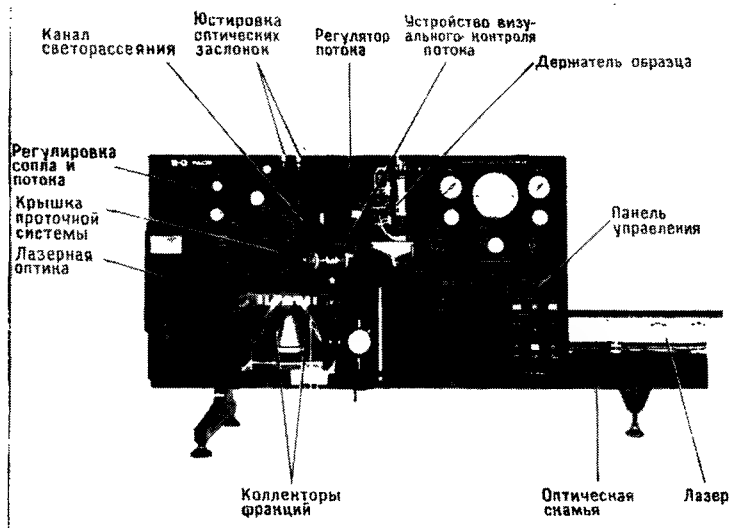


Рис. 6.5. Блок регистрации FACS440

Поставляемые сопла и фильтры обеспечивают сортировку клеток с диаметром до 30 мкм. Клетки с диаметром до 100 мкм могут анализироваться в системе в специальном режиме.

После входа в систему поток пересекает лазерный луч на уровне примерно на 250 мкм ниже кончика отверстия. Благодаря такому расположению время прохождения клетки от участка пересечения с лучом лазера до участка образования капли минимально. Одним из результатов этого является максимально возможная скорость сортировки при сохранении высокой чистоты. Кроме того, отсутствие отверстий между участками анализа и сортировки позволяет избежать каких-либо изменений скорости тока клетки. Другой важной особенностью является исключение возможности загрязнения клеток, прошедших участок лазерного облучения и светособирающей оптики.

Капли, генерируемые электромеханическим преобразователем, заряжаются с помощью положительных или отрицатель-

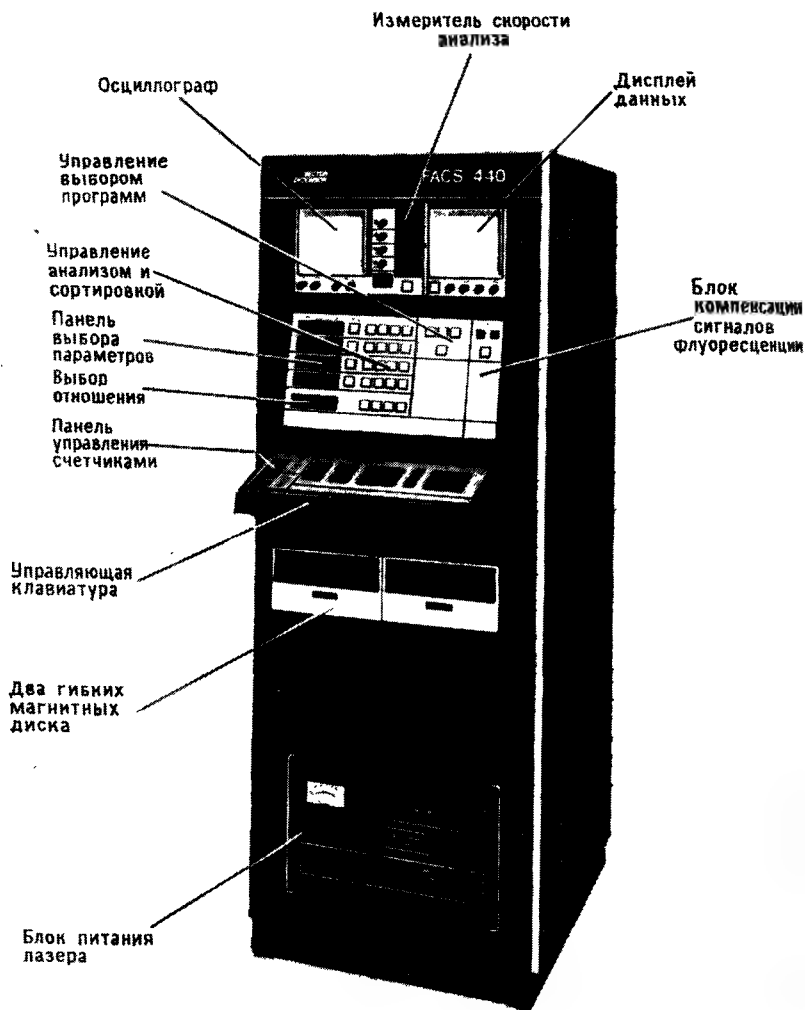


Рис. 6.6. Блок электронного управления FACS440.

ных импульсов, прилагаемых к потоку в момент ее отрыва. Отклонение достигается при прохождении заряженных капель между съемными высоковольтными электродами. Для обеспечения необходимой точности сигнал об отклонении синхронизируется образованием капли.

В этой системе может быть достигнута скорость сортировки до 5000 клеток/с. Сортировка лимитируется «эффектами совпа-

дения». Вклад «эффектов совпадения» снижается электронной схемой, прекращающей сортировку, когда клетки находятся слишком близко, чтобы их можно было разделить. Когда отбираемых клеток слишком мало (например, 1 на 10^4), то цепь отключения сортера выключается и могут достигаться более высокие скорости сортировки и анализа. Это обуславливает получение еще не чистого, но обогащенного образца, который может быть центрифугирован и повторно подвергнут сортировке с работающей цепью выключения, что приведет в конечном итоге к выделению чистой популяции клеток.

Клетки сохраняют высокий уровень жизнеспособности, и устройство FACS обеспечивает сбор клеток в стерильных условиях.

Чистота полученных фракций зависит от концентрации клеток, скорости анализа и числа отклоняемых капель. Возможно достижение чистоты от 95 до 99%. При сортировке со скоростью 2000 клеток/с и отклонении одной капли выход клеток составляет около 85%, а при отклонении двух и более капель — 90%. Результаты могут варьировать в зависимости от способа получения образца, скорости поступления клеток, размеров форсунки и скорости образования капель.

2.2.3. Обработка сигнала и дисплей

Микрокомпьютер FACS440 обеспечивает и анализ высоты пиков, и функции рамочного отбора. Все контрольные и рамочные команды устанавливаются с помощью кнопок на передней панели. Микрокомпьютер снабжен 4096 каналами памяти в качестве стандарта, и каждый канал имеет емкость 10^6 отсчетов. Данные выдаются на двусековой экран осциллоскопа и могут быть выражены в виде точечного графика или однопараметрической гистограммы. С помощью разъемных переходов FACS440 может быть соединен с двухкоординатным самописцем, линейным принтером и внешним компьютером (серии Консорт). Экспериментальные результаты могут быть распечатаны в виде гистограммы через серийное соединение RS232 либо в форме необработанных данных через параллельный интерфейс.

3. Вывод данных

Оптические сигналы от проходящей через аппарат клетки преобразуются фотоумножителем в аналоговые сигналы, которые обрабатываются различными блоками за время, сопоставимое со временем измерения, для получения величин площади под сигналом, его пикового значения и его ширины на высоте половины максимума. Первая величина позволяет от-

делять клетки с одной и той же общей флуоресценцией (одинаковая площадь под сигналом) от клеток с другим пиком сигнала флуоресценции.

Выходное устройство аналоговой части выдает описательную цитограмму либо посылает сигналы в аналого-цифровой преобразователь, который переносит данные в многоканальный анализатор и сохраняет их.

Вычисления могут проводиться по одному, двум или трем параметрам, что обеспечивает коррелятивный анализ данных от одного или более детекторов на двумерных или трехмерных гистограммах.

3.1. Описательные цитограммы

Аналоговые сигналы, производимые двумя ФЭУ (например, данные по светорассеянию и флуоресценции), собираются в осциллооскопе с памятью и представляются на его экране в виде двумерного графика, где каждая клетка представлена одной точкой (рис. 6.7, нижняя часть). Фокусы плотности на этих гистограммах могут представлять кластеры интересующих клеток, и могут быть задействованы пороговые системы для подсчета числа клеток или для запуска клеточного сортера, отбирающего клетки из интересующих областей дисплея.

3.2. Гистограммы

Гистограммы производятся многоканальными анализаторами установок либо в форме двумерных гистограмм (рис. 6.8) (интенсивность флуоресценции против числа клеток), либо в форме трехмерных гистограмм (флуоресценция и светорассеяние против числа клеток). Если данные собираются одновременно с двух различных ФЭУ, то требуются более сложные многоканальные анализаторы. Трехпараметрические гистограммы могут также создаваться некоторыми компьютерами, откладывающими частоту распределения клеток по параметрам X , Y и Z . Количество клеточных параметров, определяемых одновременно, характеризует оснащение установки для проточной цитометрии.

3.3. Компьютерный анализ данных

Данные, собранные в многоканальном анализаторе, могут быть обработаны для получения статистических оценок, для проверки совпадения с теоретической моделью или для сравнения результатов с полученными ранее. Эти задачи решаются с помощью различного типа компьютеров, некоторые из которых содержат программное обеспечение, предназначенное для

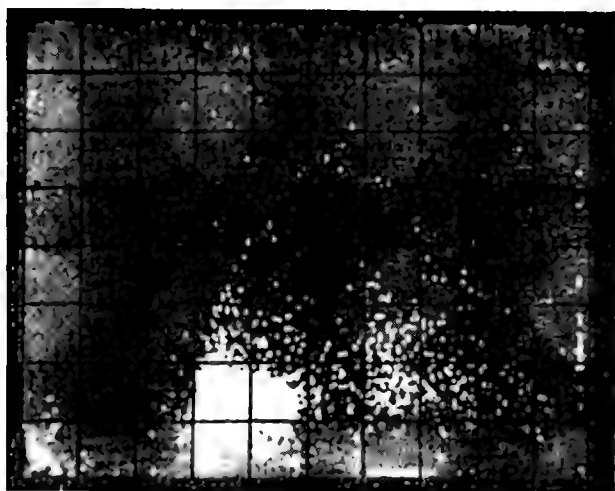
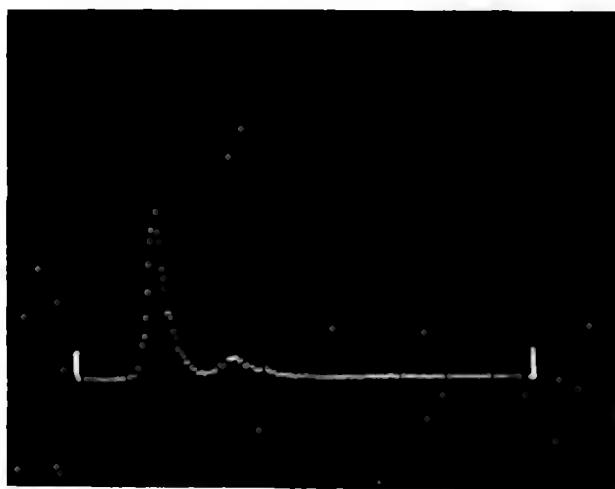


Рис. 6.7. Клетки FHI (клетки кишечного эпителия эмбриона человека), окрашенные митрамицином, как указано в тексте. На верхнем рисунке приведена зависимость числа клеток (ордината) от величины флуоресценции (абсцисса). На нижнем рисунке те же клетки представлены в форме точечной гистограммы: светорассеяние — по оси ординат, флуоресценция — по оси абсцисс (пороги флуоресцентного сигнала установлены шире, чем на верхнем рисунке). Данные получены с помощью Б. Д. Янг и Р. Силлар.

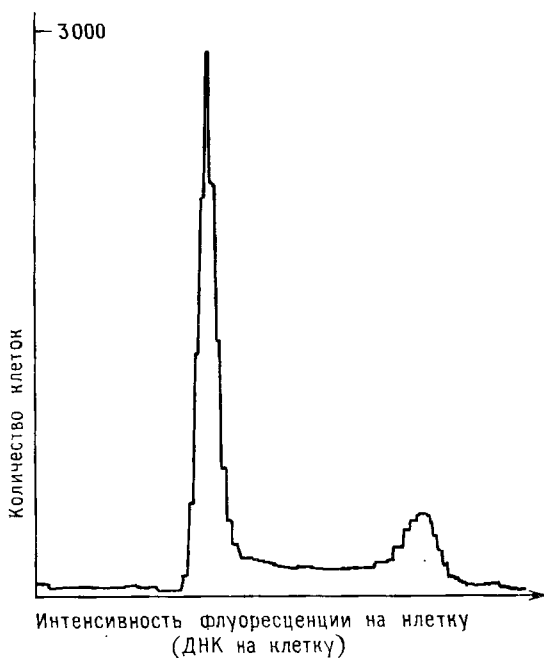


Рис. 6.8. Окрашивание ДНК пропидиййодидом. (Данные получены от Л. Мораска, Институт Марио Негри, Милан.)

наиболее распространенных типов анализа. При наличии оператора, обеспечивающего программирование, возможно использование более дешевого набора оборудования.

4. Подготовка образцов

Проточная цитометрия регистрирует один или более сигналов от каждой индивидуальной частицы, проходящей через световой луч. Следовательно, клетки суспендируют до одиночных, и в суспензии не должно содержаться агрегатов или клеточных обломков. Краситель должен быть специфичным и не вытекать из клеток в среду.

4.1. Суспензии клеток из различных тканей

4.1.1. Образцы крови

Реагенты и материалы

Гепаринизированные пробирки.

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса или ФСБ в модификации Дюльбекко.

Фиколл-Гипак или его эквивалент $1,077 \text{ г/см}^3$ (Flow Laboratories, Pharmacia, Nygaard).

Универсальные контейнеры (Sterilin) или центрифужные пробирки объемом 25 мл.

- I. Клетки крови не требуют дезагрегации, но фибрин может образовывать сгустки, препятствующие току жидкости в системе и способствующие агрегации одиночных клеток. Поэтому свежая кровь должна собираться в гепаринизированные пробирки.
- II. Разведите кровь четырьмя объемами ФСБ или раствора Хэнкса и нанесите 10 мл разведенной крови на слой из 5 мл Фиколла-Гипак в универсальном контейнере или центрифужной пробирке на 2,5 мл. Благодаря этой процедуре вы избавитесь от эритроцитов.
- III. Центрифугируйте при 1600 об/мин в течение 20 мин.
- IV. В конце центрифугирования одноядерные клетки образуют видимый слой на границе раздела ФСБ и Фиколла. Отсосите этот промежуточный слой и ресуспендируйте в 10 мл буфера.
- V. Дважды повторите центрифугирование при 1200 об/мин по 10 мин.
- VI. Суспендируйте конечный осадок в растворе Хэнкса до концентрации 10^6 клеток/мл и анализируйте проточной цитометрией.

4.1.2. Дезагрегация солидных тканей

Ферментативная дезагрегация

Ферменты, используемые для дезагрегации ткани, можно подразделить на три класса: ферменты, действующие на волокнистые структуры (коллаген или эластин) [1]; ферменты, гидролизующие мукополисахариды, например гиалуронидаза; неспецифические протеолитические ферменты (трипсин, проназа и диспаза). При использовании ферментативной дезагрегации следует принимать во внимание много факторов: среда, в которой растворены ферменты, продолжительность воздействия ферментов на ткань, температура, pH, концентрация используемого фермента, а также метод остановки действия фермента [2].

- I. *Трипсин*. 0,25%-ный раствор грубого трипсина [3] способен дезагрегировать большое количество тканей [4—9]; после продолжительной обработки трипсином при 37°C жизнеспособными оказываются 90—95% клеток [9]. Трипсин часто используется в комбинации с хелатирующими агентами (см. ниже).
- II. *Проназа*. Получаемая из *Streptomyces griseus* проназа представляет собой другой фермент, также часто исполь-

зуемый при работе со многими тканями [10—14]. В большинстве описанных случаев используется 0,1%-ный раствор проназы [12]. Результаты многих исследований показывают, что с одинаковым эффектом можно обрабатывать ткани высокими концентрациями проназы в течение короткого времени и низкими концентрациями фермента в течение длительного времени. Подобно трипсину, проназа используется в комбинации и с другими ферментами, например ДНКазой [14].

III. *Коллагеназа*. Используется при дезагрегации многих тканей, таких как мышинная меланома, мышинные опухоли тучных клеток, лимфогранулематоз человека, опухоли селезенки и яичников человека [8, 16, 17].

В грубых препаратах коллагеназы могут содержаться другие протеазы, и даже очищенный препарат содержит примесь гиалуронидазы [1]. Обработка очищенной коллагеназой может не приводить к получению одноклеточной суспензии, особенно при действии на эпителиальные клетки, и потому должна использоваться в комбинации с трипсином или проназой. Коллагеназа применяется в различных концентрациях — от 100 до 1000 ед./мл в культуральной среде в течение 15 мин при 37°C. Бактериальная коллагеназа, как и проназа, не подавляется сывороткой, так что возможно длительное (до нескольких суток) воздействие фермента в полной среде с сывороткой.

Хелатирующие агенты

Другим подходом к получению суспензии клеток из солидной ткани является обработка ткани хелатирующими агентами, обычно в сочетании с ферментами. При использовании только хелатирующих препаратов выход интактных клеток в суспензию оказывается ниже, чем после ферментативной обработки. К наиболее часто используемым хелатирующим агентам относятся ЭДТА, этиленгликоль (2-аминоэтиловый эфир)-п, пI-тетраацетат (ЭГТА) и цитрат.

ЭДТА связывает ионы Ca^{2+} и ионы Mg^{2+} и используется в концентрациях 0,01—0,10 М. ЭГТА используется в концентрации 0,1 мМ. Оба хелатирующих агента растворяются в ФСБ или солевом растворе без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Цитрат используется в концентрации 40 мкМ [19, 20].

Механическая дезагрегация

Мягкие ткани, содержащие небольшое количество фиброзной ткани, могут быть иногда переведены в суспензию одиночных клеток путем механической дезагрегации, хотя число полученных этим методом живых клеток всегда меньше, чем после использования других методов. Другой недостаток механической дезагрегации заключается в том, что высвобож-

дающиеся из ткани клетки остаются в кластерах, а не в виде одиночных клеток. Механическая дезагрегация клеток достигается продавливанием фрагментов тканей через серию сит с постепенно уменьшающимся размером ячеек (250, 100 и 20 мкм) или через иглы шприца со снижающимся размером (например, 18, 21 и 23G) [2; 21; 22].

Трудно рекомендовать какой-либо один метод для дезагрегации солидной ткани (особенно солидных опухолей). Для одной ткани подходит один метод; при этом клетки оказываются неповрежденными. Этот же метод может быть совершенно непригоден для другой ткани. При начале работы с новой тканью придерживайтесь схемы, приведенной ниже; дальнейшее же развитие исследований должно основываться на опыте и на анализе литературы.

Реагенты и материалы (стерильные)

Ножницы или пара скальпелей.

Магнитная мешалка.

Сита из нейлона или нержавеющей стали с размером ячеек 100 и 20 мкм.

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса.

Растворы ферментов: 0,25%-ный трипсин в ФСБ; 1 мМ ЭДТА в ФСБ; 0,1%-ная проназа (Sigma) в ФСБ или полной культуральной среде; ДНКазы (100 мкг/мл, конечная концентрация 1—5 мкг/мл) (Sigma Worthington). Коллагеназа градации CLS (Worthington) или градации 1 (Sigma); исходный раствор 2000 ед./мл, конечная концентрация 100—1000 ед./мл.

- I. Поместите ткань в раствор Хэнкса при 4°C. Разрежьте ткань на фрагменты размером 1 мм³ с помощью ножниц или перекрестных движений скальпелей и дважды промойте раствором Хэнкса.
- II. Слейте раствор Хэнкса и замените его раствором ферментов для дезагрегации в соотношении 10—15 мл на 1 г ткани.
- III. В конце ферментативного переваривания остановите действие ферментов путем переноса в лед или добавления сыворотки и клетки, отделенные от фрагментов ткани, центрифугируйте 10 мин при 1200 об/мин. Фильтрация через сита с уменьшающимися размерами ячеек (100 и 20 мкм) позволит освободиться от клеточных агрегатов и крупных клеточных обломков.

Примечание.

Если вы собираетесь определять содержание ДНК в клетках, не добавляйте к препаратам ДНКазу. В других случаях можно добавлять ДНКазу (1—5 мкг/мл) для того, чтобы свести к минимуму реакрегацию, обусловленную высвобождением ДНК из лизированных клеток.

4.1.3. Фиксация суспензии клеток

Клеточная суспензия может быть использована как в виде живых интактных клеток, так и в фиксированном состоянии. Фиксированные клетки используются для дальнейшего окрашивания и последующего анализа проточной цитометрией. Наиболее часто используется фиксация этанолом.

Реагенты и материалы

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса или ФСБ, свободные от Ca^{2+} и Mg^{2+} , и содержащие 1 мМ ЭДТА.

Этанол 95%-ный.

- I. Суспендируйте клетки в холодном растворе Хэнкса без Ca^{++} и Mg^{++} , содержащем 0,5 мМ ЭДТА до концентрации 1×10^6 клеток/мл.
- II. Поддерживая температуру суспензии 4°C, добавляйте по каплям 95%-ный этанол при постоянном перемешивании до достижения соотношения 3 объема этанола на 1 объем клеточной суспензии, так чтобы конечная концентрация этанола составляла 70%.
- III. Выдержите клетки в суспензии в течение нескольких минут.
- IV. Перед цитофотометрией клетки должны быть освобождены от этанола центрифугированием и ресуспендированы в фосфатном буфере или другом реагенте.

5. Примеры типов исследований

5.1. Светорассеяние неокрашенных клеток

Присутствие в световом пучке каких-либо частиц, например клеток, нарушает однородность пучка и приводит к перераспределению падающего света. Характер реэmissions энергии клетками оказывается сложным, и дифракция, преломление и отражение света взаимодействуют между собой в зависимости от объема клеток, их поверхностной конфигурации и внутренних структур. Имеющиеся в продаже установки обычно измеряют светорассеяние в двух фиксированных положениях: малоугловое прямое рассеяние под углом около 10° и рассеяние под углом 90°.

Рассеяние под углом 90° обусловлено главным образом дифракцией и определяется внутренними структурами клеток. Малоугловое прямое рассеяние рассматривается как наиболее представительное выражение клеточного объема [22—23] (рис. 6.9).

Измерение рассеяния Реагенты и материалы

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса.

- I. Суспендируйте клетки в растворе Хэнкса до концентрации $1 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^6$ клеток/мл.
- II. Заполните резервуар прибора, содержащий обволакивающую жидкость, раствором Хэнкса.

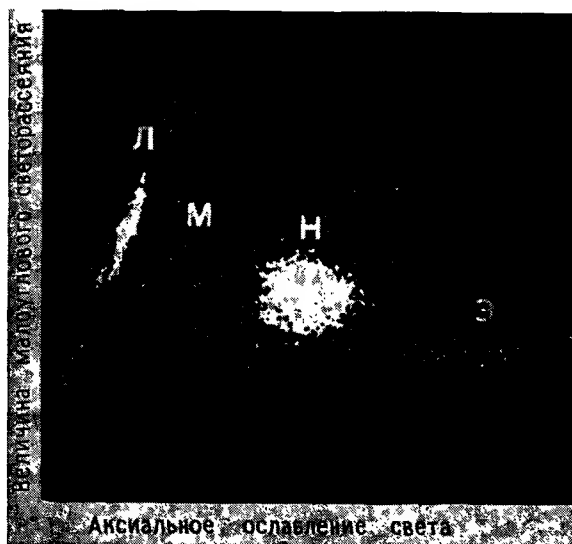


Рис. 6.9. Светорассеяние неокрашенных клеток (Ortho Instruments 410 University Avenue, Westwood MA02090). Дифференциальный подсчет нейтрофилов (Н), эозинофилов (Э), лимфоцитов (Л) и моноцитов (М) в крови человека нефлуоресцентным методом.

- III. Установите скорость прохождения клеток через прибор 500 клеток/с.

5.2. Процедура окрашивания

5.2.1. Окрашивание ядер и ДНК в суспензии пропидиййодидом

Пропидиййодид является аналогом этидиумбромид; он интеркалирует в спирали нуклеиновых кислот, что сопровождается 20-кратным увеличением его флуоресценции. Интенсивность флуоресценции пропидиййодида в 1,8 раза превышает интенсивность флуоресценции этидиумбромид. При возбуждении светом с длиной волны 488 нм максимум эмиссии комплекса про-

пропидийиодида с ДНК приходится примерно на 615 нм [21, 34—42].

Типичная гистограмма представлена на рис. 6.8, где главный пик соответствует клеткам в фазе G_1 , минорный пик — клеткам в фазе G_2/M , а промежуток между ними заполнен клетками в S-фазе. Абсолютные значения могут быть получены путем использования стандартов, например эритроцитов кур, анализируемых одновременно с клетками образца.

Содержание ДНК в клетках мышинной легочной карциномы Льюиса (3LL)

Реагенты

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса.

Окрашивающий раствор:

0,1%-ный цитрат натрия 100 мл.

Пропидийиодид 5 мг.

1%-ный Нонидет Р40 (водный раствор) 900 мкл.

- I. Удалите опухоли у мышей линии C57BL/6 и промойте их фосфатным буфером в чашке Петри.
- II. Удалите соединительную ткань и жир и измельчите ножницами.
- III. Продавите маленькие кусочки ткани через иглу (1,20 × 38 мм) и ресуспендируйте в растворе Хэнкса при 4°C.
- IV. Окрасьте суспензию клеток 3LL добавлением 3 мл раствора пропидийиодида к 200—300 мкл суспензии в концентрации 500 000 клеток/мл.
- V. Перед определением флуоресценции выдержите клетки при 4°C в течение 20—30 мин.
- VI. Измеряйте эмиссию флуоресценции между 580 и 750 нм для исключения перекрытия с областями возбуждающего света и флуоресценции несвязавшегося пропидийиодида.

5.2.2. Применение к культивируемым клеткам

Реагенты. Те же, что в разд. 5.2.1.

- I. Удалите среду из культуральной посуды и дважды сполосните клетки раствором Хэнкса.
- II. Добавьте 5 мл раствора пропидийиодида и оставьте на 10 мин при 4°C.
- III. Отделите ядра путем многократного пипетирования и проанализируйте проточной цитометрией.

5.2.3. Окрашивание пропидийиодидом ДНК в цвпых клетках

Реагенты

70%-ный этанол.

Пропидийиодид (50 мкг/мл), содержащий 40 мкг/мл РНКазы.

- I. Зафиксируйте клетки в 70%-ном этаноле (см. разд. 4.1.3).
- II. После центрифугирования слейте спирт и окрасьте порции клеток ($1 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^6$ клеток/мл) пропидиййодидом в течение 30 мин при комнатной температуре.

5.2.4. Окрашивание ДНК митрамицином и пропидиййодидом

В комбинированном методе окрашивания, использующем флуоресцентный антибиотик митрамицин и пропидиййодид, происходит перенос энергии с донорных молекул митрамицина на акцепторные молекулы пропидиййодида.

Этот метод используется для окраски и анализа образцов солидных опухолей, клеток спермы и гинекологического материала, а также клеток культуры ткани [43].

Реагенты

Митрамицин (10 мкг/мл).

Пропидиййодид (10 мкг/мл).

Хлористый магний (15 мМ).

0,1%-ный Нонидет Р40.

Трис-НСl pH 7,5.

- I. Суспензия клеток должна быть использована сразу после получения или не позднее, чем через неделю после фиксации 70%-ным этанолом.
- II. Окрасьте раствором пропидиййодид/митрамицин при 4°C в течение часа.
- III. После окрашивания пропустите клетки через проточный цитометр, возбуждаемый ртутной лампой (100 Вт) с запирающим фильтром BG12 (3 мм) и одиночным фильтром K590.

5.2.5. Окрашивание ДНК и РНК акридиновым оранжевым

Для дифференциальной идентификации ДНК и РНК используют метакроматические свойства акридинового оранжевого. Акридиновый оранжевый — это флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот в фиксированных и нефиксированных клетках, маркер лизосом. Его можно использовать также для наблюдения изменения метакромазии флуоресценции в мертвых клетках или для дифференциации клеток в фазе G_0 и клеток, проходящих клеточный цикл.

Несмотря на технические трудности в получении воспроизводимых измерений ДНК и РНК, этот метод чрезвычайно широко используется некоторыми группами исследователей [44—57].

Дифференциальное окрашивание ДНК и РНК.

Реагенты

Раствор А: стабилен в течение 2 нед, должен храниться на холоду.

0,1%-ный тритон X-100 0,1 мл.

1N HCl 8 мл.

1 M NaCl 15 мл.

Дистиллированная вода 76 мл.

Общий объем 100 мл, pH 1,5.

Раствор Б: стабилен несколько месяцев.

0,01 M ЭДТА 10 мл.

1 M NaCl 15,5 мл.

0,4 M Na_2HPO_4 31,5 мл.

0,2 M лимонная кислота 18,5 мл.

Дистиллированная вода 24 мл.

Общий объем 99 мл, pH 6,0.

Исходный раствор акридинового оранжевого

1 мг/мл в дистиллированной воде.

Примечание. Акридиновый оранжевый обладает канцерогенной активностью, обращаться с осторожностью.

Рабочий раствор акридинового оранжевого

0,1 мл исходного раствора смешать с 9,9 мл раствора Б.

Примечание. Система омывающей жидкости прибора должна храниться при 4°C.

Аргоновый лазер; линия возбуждения 488 нм.

Красная флуоресценция — ДНК (максимум флуоресценции выше 600 нм).

Зеленая флуоресценция — РНК (максимум флуоресценции выше 530 нм).

I. Добавьте 0,2 мл суспензии клеток ($8 \cdot 10^6$ клеток/мл) в фосфатном буфере с 15% сыворотки к 0,4 мл раствора А и проинкубируйте 45—60 с при 4°C.

II. Добавьте 1,2 мл раствора красителя в растворе Б и проинкубируйте 2 мин при комнатной температуре.

III. Проведите анализ на проточном цитометре в течение 10 мин после добавления раствора Б.

Примечание.

Каждый этап этой процедуры важен для получения достоверных результатов. Особое внимание следует обратить на поддержание постоянного числа окрашиваемых клеток, поскольку результат зависит от соотношения нуклеиновых кислот и акридинового оранжевого, особенно метакромазия РНК. Продолжительность экспонирования в окрашивающем растворе и его температура также сильно влияют на результаты реакции.

5.3. Применение процедур окрашивания

5.3.1. Дифференциальное окрашивание денатурированной и двунитовой ДНК

Реагенты

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса с РНКазой А (1000 ед/мл).

0,2 М KCl, pH 1,35.

Акридиновый оранжевый; 5 мкг/мл (16,7 мкМ) в 0,1 М лимонной кислоте.

0,2 М Na_2HPO_4 -буфер, pH 2,6.

I. Суспендируйте $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл раствора Хэнкса с РНКазой.

II. Инкубируйте при 37°C в течение 1 ч.

III. Смешайте 0,2 мл клеточной суспензии ($4 \cdot 10^5$ клеток/мл) (в растворе Хэнкса с РНКазой) с 0,5 мл 0,2 М KCl pH 1,35 при 20°C и инкубируйте 30 с.

IV. Добавьте к клеткам 2 мл раствора акридинового оранжевого и инкубируйте 2 мин.

V. Зеленая (530 нм) и красная (600 нм) флуоресценция отражает количество денатурированной и двухцепочечной ДНК в клетках соответственно.

Примечание.

См. приложение к разд. 5.2.5.

5.3.2. Анализ клеточного цикла с помощью бромдезокситуридина (BrdU) и красителя Хёхст 33258

Краситель Хёхст 33258 флуоресцирует в диапазоне 410—480 нм после возбуждения ультрафиолетом с длиной волны 315 нм. Он специфически связывается с парами оснований тимин — аденин и специфичен, следовательно, не только к ДНК, но и к присутствию тимидина. При анализе клеточного цикла инкубация клеток с БУДР приводит к замене тимидина в новообразованной ДНК на БУДР. Клетки, прошедшие S-фазу, остаются по содержанию тимидина такими же, как и диплоидные клетки; после деления они дают на гистограмме новый пик, соответствующий половинному содержанию тимидина в диплоидных клетках.

Этот метод позволяет проводить прямое измерение суммарного времени прохождения клетками фаз G_2 и M [58—63].

Реагенты

Среда, содержащая БУДР (33 мкг/мл) и бромдезокситидин (26,4 мкг/мл) (эквиволярные концентрации).

Окрашивающий раствор: Хёхст 33258 в ФСБ.

Клетки пропускают через прибор примерно через 2 ч после окрашивания. По литературным данным окрашивание стабильно в течение 30 мин — 24 ч.

- I. Смешайте среду с БУДР с ростовой средой в соотношении 1 : 10.
- II. Инкубируйте клетки в течение различных промежутков времени в соответствии с предполагаемой продолжительностью клеточного цикла.
- III. После инкубации диссоциируйте клетки, как это делается для пересева
- IV. Ресуспенсируйте клетки непосредственно в растворе для окрашивания.

5.3.3. Окрашивание ДНК жизнеспособных клеток с помощью Хёхст 33342

Хёхст 33342 может быть использован для прижизненного окрашивания ДНК. Известно, что этот краситель обеспечивает достаточно высокое пропорциональное окрашивание ДНК, и клетки при этом сохраняют жизнеспособность. Возбуждение красителя проводится ультрафиолетом при 350—363 нм, а эмиссия флуоресценции регистрируется при длинах волн выше 450 нм [64—67].

Реагенты

0,25 М Хёхст 33342 в дистиллированной воде.

- I. Клеточную суспензию (10^6 клеток/мл) окрасьте раствором краски Хёхст 33342 (5—10 мкм) при комнатной температуре в течение 20 мин.
- II. Не промывайте клетки перед анализом.

5.3.4. Окрашивание белков ФИТЦ

Реагенты

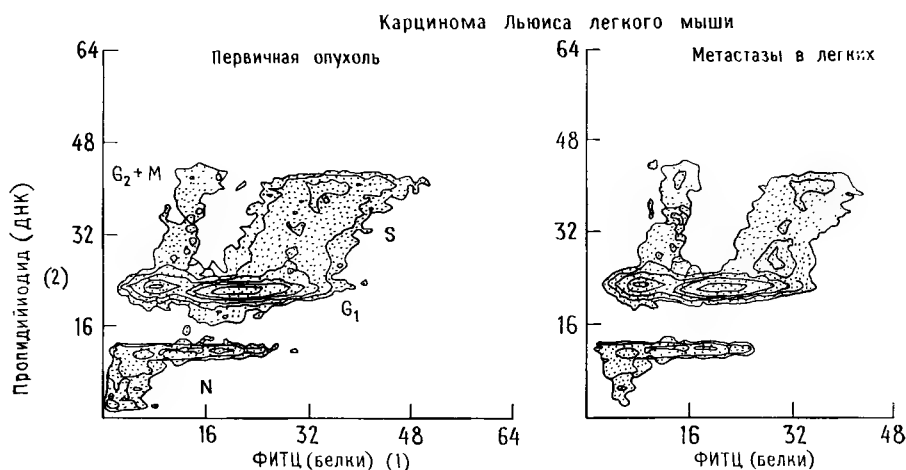
70 %-ный этанол.

Изотиоцианат флуоресцеина (ФИТЦ): 0,1—1,0 мкг/мл растворяют в ФСБ, содержащем 40 мкг/мл РНКазы.

- I. Фиксируйте клетки в 70 %-ном этаноле перед окрашиванием не менее 18 ч.
- II. Центрифугируйте фиксированные клетки для удаления фиксатора.
- III. Окрасьте клеточные белки раствором ФИТЦ в течение 30 мин при комнатной температуре.
- IV. Анализируйте в проточном цитометре с аргоновым лазером при линии возбуждения 488 нм и эмиссией флуоресценции в диапазоне 515—555 нм.

5.3.5. Двойное окрашивание ДНК и белков

Для одновременного окрашивания фиксированные клетки обрабатывают раствором, содержащим пропидиййодид (18 мкг/мл в 0,1%-ном цитрате натрия), ФИТЦ (0,05 мкг/мл) и РНКазу (40 мкг/мл) в ФСБ при комнатной температуре не менее 20 мин (рис. 6.10).



5.4. Метод флуоресцентных антител с использованием флуоресцеина

Прямое иммунофлуоресцентное окрашивание клеточной поверхности

Этот метод используется для выявления клеток, обладающих специфическими мембранными антигенами. Клетки для этого обрабатываются моноклональными антителами, конъюгированными с флуоресцеином или родамином.

Реагенты

Конъюгированные с ФИТЦ антитела разводятся средой MEM с фосфатным буфером, содержащей 0,1% азида натрия и 2% телячьей сыворотки. Для определения оптимальной концентрации антител добавьте по 50 мкл различных разведений антител к клеткам на микротитровальной пластинке. Анализируйте окрашивание с помощью флуоресцентной микроскопии. При использовании антител LEU-1 к клеткам человека разбавляйте их до концентрации 5 мкг/мл (0,25 мкг/50 мкл).

Клетки мыши и человека в концентрации $2 \cdot 10^7$ клеток на лунку должны быть жизнеспособны не менее чем на 90%.

- I. Внесите по 50 мкл клеток на лунку микротитровальной пластинки, содержащей в лунках по 50 мкл разведенной сыворотки, перемешайте.
- II. Инкубируйте 50 мин на льду.
- III. Центрифугируйте пластинку при 500 g.
- IV. Отбросьте супернатант и дважды промойте осадки клеток MEM с буфером. Центрифугируйте клетки после каждой промывки при 500 g и отсасывайте супернатанты после промывки.
- V. Для анализа методом проточной цитометрии ресуспендируйте клетки в холодной среде MEM до концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток/мл; выдерживайте их на холоду до анализа [73, 74].

6. Обсуждение

В распоряжении исследователя, использующего проточную цитометрию, имеется большой выбор инструментов. Инструменты сходны, но не идентичны, поскольку каждый из них приспособлен для определенного типа экспериментов. Характеристиками приборов являются источники возбуждающего света, чувствительность фотоумножителей и компьютерная обработка.

Высокое разрешение всегда легко достигается при использовании когерентного света лазера с низкой интенсивностью и с узким пучком, фокусируемым на поток клеток.

Высокая чувствительность достигается только при использовании очень дорогих мощных лазеров, потребляющих значительное количество энергии (многоволновой аргоновый лазер с мощностью на выходе 18 Вт требует затраты энергии около 50 кВт/ч, а наиболее употребляемый 4-Вт аргоновый лазер потребляет более 22 кВт/ч). Высокая мощность возбуждения требуется, например, если необходимо выявлять иммунофлуоресценцию небольшого числа мембранных рецепторов или когда флуорохромы требуют возбуждения в ультрафиолетовой области, где и аргоновые, и криптоновые лазеры обладают невысокой эффективностью. Кроме того, чем шире диапазон линий включенного в установку лазера, тем выше ее стоимость, а также потребление энергии. Следует учитывать, однако, что при использовании флуорохромов, аналогичных пропидийиодиду, анализ содержания нуклеиновых кислот в клетках позвоночных можно проводить с помощью относительно маломощного лазера (100 мВт), а исследования с использованием митрамицина и пропидийиодида требуют ртутной лампы с мощностью 100 Вт.

Сортировку клеток (сортинг) следует рассматривать отдельно от аналитического использования прибора. Для сортирования необходимо использовать более сложную электронику. Следует учитывать, что при препаративной работе нельзя использовать прибор на пределе чувствительности и разрешения. Сортировка клеток обеспечивает получение в высокой степени однородных клеточных суспензий по выбранным параметрам. Все приведенные выше методы пригодны для сортирования. Следует отметить, что лишь немногие из них применимы к живым клеткам. Эта область требует дальнейшего развития. Другие ограничения метода сортирования носят технический характер: прежде всего, между каплями жидкости с клетками протекает по крайней мере 15 пустых капель с обволакивающим раствором. Это означает, что собираемые клетки сильно разбавляются и их последующее концентрирование сопровождается неизбежными потерями.

Увеличение скорости анализа сильно снижает чистоту получаемых препаратов, и паспортную скорость в 5000 клеток/с, предлагаемую поставляющими фирмами, следует рассматривать как максимальную, позволяющую получать препараты высокого качества. Более эффективное разделение достигается при скорости протока клеток не выше чем 2000 клеток/с. Эта скорость относится ко всем клеткам, проходящим через форсунку; реальный выход сортируемых клеток зависит от соотношения между сортируемыми клетками и клетками, которые отбрасываются, поскольку компьютер во время их прохождения занят обработкой информации, поступившей от предыдущих клеток. На практике низкая частота капель, содержащих клетки (1 капля с клеткой на 15 пустых капель), служит для решения именно этой проблемы, а также для снижения вероятности попадания двух клеток в одну каплю.

Время сортирования, необходимое для отбора достаточного количества клеток нужного типа, может быть весьма продолжительным. Это делает эксперименты менее эффективными, поскольку возрастает вероятность полной или частичной закупорки форсунки клеточными обломками, агрегатами или различными посторонними материалами. Изменения условий прохода клеток через форсунку оказывают наиболее серьезное влияние на потерю клеток и чистоту получаемых препаратов.

Все эти недостатки метода изложены на основе нашего собственного опыта работы. Перспективы проточной цитометрии и сортирования клеток хорошо известны каждому ученому, и энтузиазм в связи с новыми возможностями, предоставляемыми этой техникой, приводит к недооценке сложностей и ограничений, присущих технологии в целом или типу используемого оборудования.

7. Благодарности

Детали проточного цитометра Ortho Cytofluorograf и клеточного сортера с активируемой флуоресценцией FACS 440 воспроизведены с любезного разрешения фирм Ortho Diagnostic Systems Inc. и Becton Dickinson (UK) Ltd соответственно.

Литература

1. Waymouth C. (1974). In Vitro, **19**, 97.
2. Pretlow T. G., Weir E. E., Zettergren J. C. (1975). International Review of Experimental Pathology, Vol. 14, Richter G. W., Epstein M. A. (eds.), Academic Press, New York, p. 91.
3. Mahler H. R., Cordes E. H. (1966). Biological Chemistry, published by Harper & Row, New York.
4. Brattain M. G., Kimball P. M., Pretlow T. G., II et al. (1977). Br. J. Cancer, **35**, 850.
5. Kreisberg J. I., Pitts A. M., Pretlow T. G., II. (1977). Am. J. Pathol., **86**, 591.
6. Willson J. K. V., Luberoff D. E., Pitts A. et al. (1975). Immunology, **28**, 161.
7. Dow S. H., Pretlow T. G., II. (1975). J. Natl. Cancer Inst., **54**, 147.
8. Morasca L., Erba E., Vaghi M., Ghelardoni C., Mangioni C., Sessa C., Landoni F., Garattini S. (1983). Br. Cancer, **48**, 61.
9. Morasca L., Erba E., Vaghi M., Amato G., Pepe S., Mangioni C., Colombo N., Landoni F., D'Incalci M. (1985). J. Exp. Clin. Cancer Res., in press.
10. Helmes S. R., Brazeal F. I., Bueschen A. J. et al. (1975). Am. J. Pathol., **80**, 79.
11. Pretlow T. G., II, Dow S. R., Murad T. M. et al. (1974). Am. J. Pathol., **76**, 95.
12. Pretlow T. G., II, Jones J., Dow S. (1974). Am. J. Pathol., **74**, 275.
13. Pretlow T. G., II, Scalise M. M., Weir E. E. (1974). Am. J. Pathol., **74**, 83.
14. Bowman P., McLaren A. (1970). J. Embryol. Exp. Morphol., **23**, 163.
15. Bowman P., McLaren A. (1970). J. Embryol. Exp. Morphol., **24**, 331.
16. Lasfargues E. Y., Moore D. H. (1971). In Vitro, **7**, 21.
17. Kraehenbuhl J. P. (1977). J. Cell Biol., **72**, 390.
18. Bashor M. M. (1979). In: Methods of Enzymology, Vol. 58, Jakoby W. B., Pastan I. H. (eds.), Academic Press, New York, p. 119.
19. Ham R. G., McKeehan W. L. (1979). In: Methods in Enzymology, Vol. 58, Jakoby W. B., Pastan I. H. (eds.), Academic Press, New York, p. 44.
20. Jacob S. T., Bhargava P. M. (1972). Exp. Cell Res., **27**, 453.
21. D'Incalci M., Torti L., Damia G., Erba E., Morasca L., Garattini S. (1983). Cancer Res., **43**, 5674.
22. Erba E., Ubezio P., Colombo T., Borggini M., Torti L., Vaghi M., D'Incalci M., Morasca L. (1983). Cancer Chemother. Pharmacol., **10**, 208.
23. Mullaney P. F., Dean P. N. (1969). Appl. Opt., **8**, 2361.
24. Mullaney P. F., Crowell J. M., Salzman G. C. (1976). J. Histochem. Cytochem., **24**, 298.
25. Jovin T. M., Morris S. J., Striker G. (1976). J. Histochem. Cytochem., **24**, 269.
26. Meyer R. A., Brunsting A. (1975). Biophys. J., **15**, 191.
27. Steinkamp J. A., Crissman H. A. (1974). J. Histochem. Cytochem., **22**, 616.
28. Sharpless T., Traganos F., Darzynkiewicz Z. (1975). Acta Cytol., **19**, 577.

29. Salzman G. C., Growell J. M., Martin J. C. et al. (1975). *Acta Cytol.*, **19**, 374.
30. Price B. J., Salzman G. C., Growell J. M. et al. (1976). *Biophys. J.*, **16**, 64a.
31. Leary J. F., Notter M. F. D., Todd P. (1976). *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 1249.
32. Gledhill B. L., Lake S., Steinmetz L. L. et al. (1976). *J. Cell. Physiol.*, **87**, 367.
33. Mullaney P. F., Fiel R. J. (1976). *Appl. Opt.*, **15**, 310.
34. Erba E., Vaghi M., Pepe S., Amato G., Bistolfi M., Ubezio P., Mangioni C., Landoni F., Morasca L. (1985). *Br. J. Cancer*, **52**, 565.
35. Crissman H. A., Mullaney P. F., Steinkamp J. A. (1975). In: *Methods in Cell Biology*, Vol. 9, Prescott D. M. (ed.), Academic Press, New York, p. 179.
36. Cram L. S., Gomez E. R., Thoen C. O. et al. (1976). *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 383.
37. Krishan A. (1975). *J. Cell Biol.*, **66**, 188.
38. Fried J., Perez A. G., Clarkson B. D. (1976). *J. Cell Biol.*, **71**, 172.
39. Bichel P., Frederiksen P., Kjaer T. et al. (1977). In: *Pulse Cytophotometry*, Lutz D. (ed.), European Press, Ghent.
40. Barlogie B., Spitzer G., Hart J. S. et al. (1976). *Blood*, **48**, 245.
41. Zante J., Schuman J., Barlogie B. et al. (1976). In: *Pulse Cytophotometry*, Gohde W., Schuman J., Bucher T. H. (ed.), European Press, Ghent, p. 97.
42. Ward D. C., Reich E., Goldberg I. H. (1965). *Science*, **149**, 1259.
43. Starace G., Badaracco G., Greco C., Sacchi A., Zuppi G. (1982). *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **18**, 973.
44. Bertalanffy F. D. (1962). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **93**, 715.
45. Nash D., Plaut W. (1964). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**, 713.
46. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T. et al. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 392.
47. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T. et al. (1975). *Exp. Cell. Res.*, **90**, 411.
48. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T. et al. (1975). In: *Pulse Cytofluorometry*, Haanen C. A. M., Hillen H. F. P., Wessels (eds.), Ghent, European Press, p. 88.
49. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T. et al. (1975). *Exp. Cell. Res.*, **95**, 143.
50. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T. et al. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2881.
51. Traganos F., Darzynkiewicz Z., Sharpless T. et al. (1977). *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 46.
52. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T. (1976). *J. Cell. Biol.*, **68**, 1.
53. Traganos F., Darzynkiewicz Z., Sharpless T. et al. (1975). *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 431.
54. Melamed M. R. (1972). *Eur. J. Cancer*, **8**, 287.
55. Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R. (1982). *Cytometry*, **2**, 201.
56. Traganos F., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R. (1982). *Cytometry*, **2**, 212.
57. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Xue S., Coico L., Melamed M. R. (1981). *Cytometry*, **1**, 279.
58. Beck H. P. (1982). *Cytometry*, **2**, 170.
59. Weissblum B., Haenssler E. (1974). *Chromosoma*, **44**, 255.
60. Steel G. C., Adams K., Barret J. C. (1977). *Growth Kinetics of Tumors*, published by Clarendon Press, Oxford.
61. Latt S. A. (1975). *Chromosoma*, **52**, 297.
62. Heiber L., Beck H. P., Huhle C. (1981). *Cytometry*, **2**, 175.
63. Bohmer R. M. (1979). *Cell Tissue Kinet.*, **12**, 101.
64. Loken M. R. (1980). *Cytometry*, **1**, 136.

65. Hamori E., Arndt-Jovin D., Grmwade B. G., Jovin T. M. (1980). *Cytometry*, **1**, 132.
66. Arndt-Jovin D. J., Jovin T. M. (1977). *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 585.
67. Fried I., Doblin J., Takamoto S., Perez A., Hansen H., Clarkson B. (1983). *Cytometry*, **3**, 42.
68. Crissman H. A., Oka M. S., Steinkamp J. A. (1976). *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 64.
69. Crissman H. A., Steinkamp J. A. (1973). *J. Cell Biol.*, **59**, 766.
70. Shapiro H. M. (1983). *Cytometry*, **3**, 227.
71. Crissman H. A., Steinkamp J. A. (1982). *Cytometry*, **3**, 84.
72. Crissman H. A., Egmond J. V., Holdrinet R. F., Pennings A., Haanen C. (1981). *Cytometry*, **2**, 59.
73. Zeile G. (1980). *Cytometry*, **1**, 37.
74. Colotta F., Peri G., Villa A., Mantovani A. (1984). *J. Immunol.*, **132**, 936.

ОРГАННАЯ КУЛЬТУРА

И. Ласнитски

1. Введение

В понятие органная культура входит получение эксплантата и выращивание *in vitro* органа или части органа, в котором различные компоненты ткани, такие как паренхима и строма, а также их анатомическая взаимосвязь и функционирование сохраняются в культуре таким образом, что эксплантированная ткань близко напоминает родительскую *in vivo*. Миграция изолированных клеток на периферии эксплантата подавляется специальными условиями культивирования, и образующиеся «новые» отростки состоят из дифференцированных структур. Так, в изолированных железах образуются новые железистые структуры, а на периферии эксплантатов легочной ткани развиваются новые мелкие бронхи. Они состоят из альвеол, окаймленных секреторным кубическим или цилиндрическим бронхиальным эпителием.

В тканях, выстланных многослойным эпителием, таких, как кожа или пищевод, или в мочевом пузыре, выстланном переходным эпителием, дифференцировка происходит примерно так же, как и в органе *in vivo*. Ткани, зависимые от гормонов, сохраняют чувствительность к ним и характерные ответы, а эндокринные органы продолжают секретировать специфические гормоны. И наконец, в эмбриональных тканях процессы морфогенеза *in vitro* и *in vivo* чрезвычайно похожи.

2. Обзор техники органной культуры

Культивирование фрагментов печени, почек, щитовидной железы и яичников кролика на небольших кровяных сгустках в культуральных пробирках впервые проведено Лёбом [1]. Он же показал, что эти ткани сохраняют свою нормальную гистологическую структуру в течение 3 сут. Его работы на 10 лет опередили исследования Гаррисона [2] по культуре ткани.

Лёб и Флейшер показали, что для предотвращения центральных некрозов в эксплантатах пробирки должны быть заполнены кислородом [3]. Необходимость присутствия кислорода отмечал также Паркер [4]; он выращивал фрагменты некоторых органов в тонком слое среды в широкодонном сосуде, заполненном 80%-ным кислородом. Этот метод оказался не-

приемлемым, поскольку большинство тканей погружалось на дно сосуда, за исключением кожи, которая всплывала на поверхность среды. Неспособность кожи к смачиванию позволила Медавару [5] выращивать срезы уха кролика на поверхности смеси, содержащей сыворотку и набор солей во флаконе, заполненном 70%-ным кислородом. К числу недостатков выращивания эксплантатов кожи в жидкой среде следует отнести тенденцию фрагментов кожи к закручиванию; помимо этого эпителий, как правило, мигрирует и вскоре начинает покрывать дермальную поверхность.

Ранее было уже показано, что большинство органов или их фрагментов, за исключением кожи, растут на твердом субстрате лучше, чем в жидкой среде.

2.1. Использование в качестве субстрата сгустка плазмы

Фелл и Робисон [6] предложили «технику часового стекла», согласно которой орган или часть органа выращивается во впадине часового стекла на поверхности сгустка, состоящего из плазмы цыпленка и эмбрионального экстракта кур. Это стало классической стандартной техникой морфогенетического анализа эмбриональных органов. Впоследствии метод был модифицирован для исследования действия гормонов, витаминов и канцерогенов на ткани взрослых млекопитающих [7], о чем более подробно сказано в гл. 3.

Другой тип культуральных сосудов представляет собой эмбриологическое часовое стекло, содержащее сгусток плазмы и покрытое стеклянной крышкой, приклеенной воском. Впервые такой сосуд был предложен Рудником [8] и позднее модифицирован Гэйлардом [9]. Гэйлард использовал сгусток, содержащий две части плазмы человека, одну часть плацентарной сыворотки человека, одну часть экстракта мозга ребенка и шесть частей солевого раствора.

Сгусток плазмы, способный поддерживать рост и развитие эмбриональных и взрослых органов, обладает тем не менее рядом недостатков. Обычно происходит его разжижение в окрестностях эксплантатов, так что последние оказываются в жидкости. Кроме того, из-за сложности среды оказывается невозможным проведение биохимических исследований.

2.2. Использование агара в качестве субстрата

Проблемы, возникающие при использовании сгустка плазмы, исчезают, если использовать сгусток агара. Техника культивирования на сгустке агара была предложена Спраттом [10, 11]. Вольф и Хаффен [12] модифицировали технику Гэйларда и

использовали для выращивания часовые стекла, содержащие агаровый гель. Агаровый метод успешно использовался в исследованиях по биологии развития и в морфогенетических исследованиях, и его детальное описание, как и описание метода выращивания на часовых стеклах, приведено в гл. 3. Поскольку агар не разжижается, он не может быть добавлен в культуру или взят для анализа без переноса культивируемого эксплантата. Для преодоления этого неудобства используются жидкие среды, в которых находятся подложки для предотвращения погружения эксплантатов.

2.3. Методы плотика

Чен [13] обнаружил, что бумага, используемая для протирания линз микроскопов, не смачивается и может плавать на поверхности жидкой среды. Он эксплантировал 4—5 культур на плотик из такой бумаги размером 25×25 мм, плавающий на поверхности жидкости в часовом стекле. Рихтер [14] улучшил эту методику, обрабатывая бумагу силиконом, что предотвращало ее погружение в среду. Лэш с сотрудниками [15] скомбинировали бумагу для протирания линз с миллипоровыми фильтрами. Они проделывали небольшое отверстие в центре плотика из бумаги и покрывали это отверстие полоской миллипорового фильтра. Это позволяло культивировать различные типы тканей на обеих сторонах фильтров и изучать взаимодействие этих тканей. Шеффер [16] заменил бумагу ацетатом вискозы. Всплывание полосок ацетата вискозы на поверхности жидкой среды достигалось обработкой силиконом четырех углов полосок. Преимущество ацетата вискозы перед линзовой бумагой заключается в том, что ацетат вискозы растворим в ацетоне и при подготовке ткани для гистологического анализа может быть растворен путем погружения в ацетон.

2.4. Метод сеток

Использование плотиков, плавающих на поверхности жидкой среды, не обеспечивает идеальных условий культивирования. Плотик часто тонет, и ткани оказываются погруженными в среду, причем на разную глубину. Эта проблема была решена с помощью техники «сеток», предложенной Троувеллом [17]. Он предложил металлическую сетку, сплетаемую вначале из танталовой проволоки. В дальнейшем танталовая сетка была заменена более жестким, пригодным для прокатки металлом, например листами нержавеющей стали [18] или титана [19]. Сетка представляет собой квадрат с поверхностью 25×25 мм с отогнутыми краями, образующими четыре ножки высотой около 4 мм. Скелетные ткани можно культивировать

непосредственно на сетке, но более мягкие ткани, такие как железы или кожа, должны быть вначале эксплантированы на полоски линзовой бумаги, а затем размещены на сетке. Сетка с эксплантатами помещается в культуральную камеру, заполненную средой как раз до поверхности сетки. Первоначально техника Троувелла была предназначена для культивирования тканей взрослых млекопитающих, которые характеризуются большей потребностью в кислороде по сравнению с эмбриональными. Для этого культуральные камеры заключали в контейнеры, которые затем продувались смесью CO_2 с кислородом. Метод успешно применялся для сохранения жизнеспособности и гистологической структуры взрослых тканей, таких как предстательная железа, почка, щитовидная железа и гипофиз. Этот метод, и особенно поддержание газовой фазы, в настоящее время значительно упростился и в модифицированной форме продолжает широко использоваться.

2.5. Чередование культивирования эксплантатов в среде и газовой фазе

Недавно для длительного культивирования взрослых тканей человека, таких как эпителий бронхов и молочной железы, пищевод и шейка матки [20—23], был успешно использован новый метод, обеспечивающий попеременное экспонирование ткани в среде и в газовой фазе. Для этого эксплантаты прикрепляются к дну пластикового культурального сосуда и покрываются средой. Сосуды затем помещают в камеру, заполняемую соответствующей газовой смесью. Камеру устанавливают на специальную платформу, которая в ходе культивирования качается с определенной скоростью.

3. Техника часовых стекол

Эта техника была первоначально предложена Феллом и Робисоном [6] для изучения развития зачатков костей конечностей птиц. В дальнейшем использование этого метода распространилось на исследование роста и дифференцировки других тканей птиц и млекопитающих. При использовании этого метода ткани птиц помещают на сгусток, состоящий из равных частей плазмы кур и экстракта куриных эмбрионов и находящийся на часовом стекле. Одно или два таких стекла кладут в чашку Петри и закрывают сверху влажной ватой или фильтровальной бумагой (рис. 7.1) для предотвращения высыхания сгустка и эксплантатов. Чашки Петри переносят в термостат и культивируют обычно при $37,5^\circ\text{C}$.

3.1. Получение эмбрионального экстракта

3.1.1. Материалы

Все реагенты и инструменты должны быть стерильными.
Оплодотворенные куриные яйца, инкубированные 7—8 дней.
Чашка Петри.

Прямые пинцеты.

Изогнутые пинцеты.

Изогнутые ножницы.

Слабо притертый стеклянный гомогенизатор Поттера — Элве-хейма с тефлоновым пестиком.

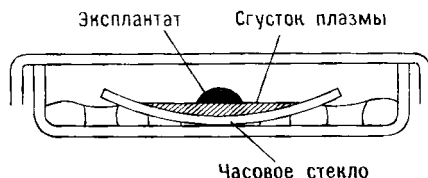


Рис. 7.1. Метод часовых стекол, разработанный Феллом и Робисоном, 1929 [6].

Центрифужные пробирки, 50 мл (Corning).

Пастеровские пипетки.

Пипетки с широким кончиком, получаемые путем отламывания носиков у обычных пипеток.

Сосуды для хранения.

Раствор Хэнкса.

70%-ный этанол.

3.1.2. Схема получения экстракта

- I. Перед выделением эмбрионов протрите тупой конец яйца ваткой, смоченной 70%-ным этанолом, для стерилизации поверхности скорлупы. Осторожно удалите верхний конец скорлупы, разрушив ее легкими ударами и отшелушив скорлупу. Внутреннюю мембрану скорлупы прорвите прямым пинцетом. Извлеките эмбрион, взяв его за голову изогнутым пинцетом, и аккуратно перенесите в чашку Петри. Тщательно промойте эмбрион раствором Хэнкса, удалите глаза и вручную измельчите с помощью изогнутых ножниц.
- II. Измельченную ткань перенесите в гомогенизатор пипеткой с отбитым кончиком и гомогенизируйте вручную в течение нескольких минут.
- III. Смешайте полученный гомогенат с равным объемом раствора Хэнкса и центрифугируйте смесь при 20 g в течение

10 мин при 4 °С. Отберите супернатант и при необходимости центрифугируйте повторно для удаления суспендированных обломков клеток. Конечный супернатант опалесцирует и не должен содержать клеток.

- IV. Экстракт должен быть использован немедленно либо разлит во флаконы по 1 мл для хранения при —20 °С. Срок хранения не более 3 мес.

3.2. Получение куриной плазмы

Не рекомендуется использовать коммерческие препараты плазмы, поскольку они обычно не формируют плотного сгустка и не обеспечивают рост и дифференцировку тканей в такой степени, как свежеприготовленная плазма.

3.2.1. Материалы

Домашние куры в возрасте 6—12 мес.

Шприц на 30 мл с иглами.

Центрифужные пробирки.

Гепарин.

3.2.2. Схема подготовки плазмы

- I. Приготовьте плазму кур по стандартной методике, описанной Полом [24]. Для снижения содержания липидов в плазме не давайте птицам корма, по крайней мере 24 ч до получения крови.
- II. Для предотвращения преждевременного свертывания плазмы используйте только силиконизированную посуду и промывайте шприц, которым вы собираете кровь, раствором гепарина (0,01—1%). Следует применять как можно более низкую концентрацию гепарина, чтобы не препятствовать образованию сгустка плазмы при ее смешивании с эмбриональным экстрактом.
- III. Проверьте плазму на стерильность (см. гл. 4) и храните в силиконизированных пробирках при —20 °С. Срок хранения не более 6 мес.

3.3. Получение эксплантатов

3.3.1. Материалы

Часовые стекла диаметром 3,5 мм.

Чашки Петри диаметром 91 мм.

Хлопковая вата или фильтровальная бумага для закрытия чашек Петри.

Стерильная дистиллированная вода или солевой раствор.

Градуированные пипетки на 10 мл.

Пастеровские пипетки.

Пипетки с широким кончиком, получаемые путем отламывания кончиков пастеровских пипеток.

Капиллярные пипетки, получаемые оттягиванием на пламени кончиков пастеровских пипеток.

Держатель пипеток (рис. 7.2).

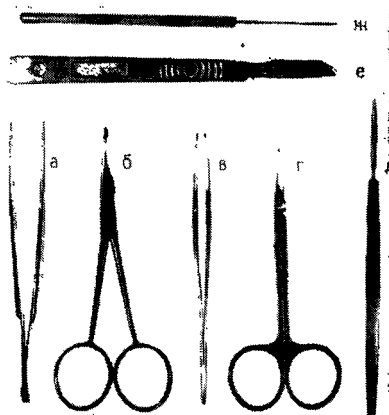
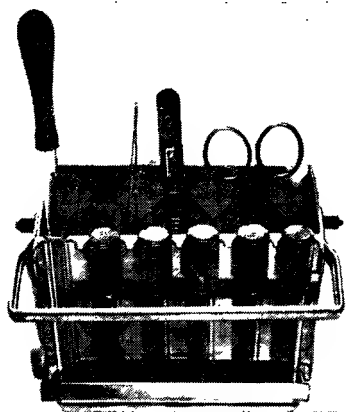


Рис. 7.2. Штатив из нержавеющей стали для пастеровских пипеток и хирургического инструмента.

Рис. 7.3. Хирургические инструменты: (а) прямой пинцет среднего размера; (б) прямые ножницы среднего размера; (в) часовой пинцет; (г) тонкие ножницы меньшего размера; (д) катарактный нож; (ж) анатомическая игла; (е) нож Сванн-Мортон.

Предметные стекла с лункой глубиной 6—7 мм.

Стеклянные предметные стекла с площадью поверхности $\sim 8 \text{ см}^2$.

Экстракт куриных эмбрионов (50%).

Инактивированная нагреванием сыворотка (56°C в течение 30 мин); для клеток млекопитающих используются сыворотки крысы, лошади или телят.

Стеклянные палочки для смешивания плазмы и экстракта.

Раствор Хэнкса.

Катарактные ножи, ножи Сванн-Мортон № 11.

Анатомические иглы.

Часовые пинцеты, прямые пинцеты 10 см.

Ножницы среднего размера.

Тонкие ножницы для операций.

3.3.2. Протокол

- I. Покройте дно чашек Петри слоем хлопковой ваты или лучше тремя слоями фильтровальной бумаги с прорезанными в них одним или двумя отверстиями диаметром 3,5 см и простерилизуйте сухим жаром (см. гл. 1).
- II. Утром в день получения эксплантатов пропитайте 10 мл стерильной дистиллированной воды или раствора Хэнкса слой ваты или фильтровальной бумаги, используя градуированную пипетку, и установите часовые стекла над отверстиями в подложке. Эти отверстия обеспечат прохождение света при работе с бинокулярной лупой и облегчат макроскопическое обследование эксплантата в ходе культивирования.
- III. Для культивирования тканей птиц приготовьте сгусток, смешивая 10 капель куриной плазмы с 10 каплями куриного эмбрионального экстракта [6]. Быстро и тщательно перемешайте смесь стеклянной палочкой.
- IV. Для культивирования тканей млекопитающих добавьте инактивированную сыворотку крысы, лошади или теленка к смеси куриного эмбрионального экстракта и плазмы кур, обычно в соотношении плазма : сыворотка : экстракт 2 : 1 : 1. Это соотношение может быть изменено в соответствии с типом используемой ткани и характером решаемой проблемы. В экспериментах, связанных с изучением влияния химических агентов на рост и дифференцировку, добавляйте исследуемое соединение к смеси до образования сгустка.
- V. Используя тонкие ножницы и часовой пинцет, удалите орган или часть органа, промойте его раствором Хэнкса и перенесите на стеклянную пластинку. С помощью катарактных ножей, анатомических игл или ножей Сwann-Мортонa, обрежьте ткань так, чтобы размер кусочка не превышал $2 \times 2 \times 2$ мм. По возможности поместите стеклянную пластинку на кусочек черной бумаги (так будет легче препарировать). Весьма существенно, чтобы в ходе работы ткань увлажнялась раствором Хэнкса.
- VI. Перенесите от одного до трех эксплантатов на сгусток с помощью катарактного ножа или пипетки с широким кончиком. В последнем случае эксплантаты обрабатывают раствором Хэнкса, размещают на сгустке и избыток жидкости отсасывают с помощью капиллярной пипетки.
- VII. Перенесите чашки Петри с одним или двумя часовыми стеклами в термостат на $37,5^{\circ}\text{C}$. Не ставьте чашки Петри непосредственно на металлические полки, а подкладывайте подставки из дерева. Это предотвратит конденсацию воды на внутренней стороне чашек Петри, которая может капать на эксплантаты и повреждать их.

3.3.3. Смена среды

Среду следует менять каждые 2—3 сут в случае тканей птиц, и каждые 3—4 сут в тканях млекопитающих. Для этой цели готовится новый сгусток по описанной ниже методике.

- I. Осторожно открепите эксплантаты от старого сгустка плазмы и поднимите их с помощью двух катарактных ножей.
- II. Перенесите эксплантаты в лунку предметного стекла, заполненную раствором Хэнкса с 2% сыворотки и промойте.
- III. После промывки отсосите эксплантаты в пипетку с широким носиком и перенесите на свежий сгусток плазмы.
- IV. Разделите и распределите эксплантаты по поверхности сгустка, используя анатомические иглы и катарактный нож.
- V. Удалите избыток жидкости, используя капиллярную пипетку.

3.3.4. Комбинация методов сгустка и плотика

Эксплантаты сначала помещают на полоски линзовой бумаги (см. разд. 7.1) либо ацетата вискозы, смоченные раствором Хэнкса, и эти полоски помещаются на сгусток. Этот метод не снижает жизнеспособность и рост эксплантированных тканей, предотвращает погружение ткани в разжижающуюся плазму и облегчает процесс смены среды. Вместо индивидуального подъема каждого эксплантата можно поднимать сразу все эксплантаты, расположенные на плотике, промывать их раствором Хэнкса, подсушивать на стерильной фильтровальной бумаге и помещать на свежий сгусток.

Техника выращивания на часовых стеклах особенно удобна для исследований зачатков костной ткани птиц [6, 26, 27], для изучения дифференцировки эпидермиса и эпителия пищевода птиц и изменения этого процесса витамином А [28, 29]. Кроме того, этот метод нашел широкое применение при исследовании действия канцерогенных агентов, стероидных гормонов и витамина А и их взаимодействия в эмбриональных тканях человека, мыши и крысы. Используя эту технику, удалось показать, что стероидные гормоны необходимы для поддержания культур органов, являющихся их мишенями, и что канцерогенные агенты индуцируют предраковые изменения, подавляемые витамином А [30—32].

Этот метод имеет ряд ограничений. Эксплантаты часто разжижают сгусток и погружаются в него, что ухудшает снабжение ткани кислородом. Сложность среды исключает проведение биохимических исследований, и длительность культивирования при использовании этого метода оказывается ограниченной. И хотя во многих экспериментах положительные результаты могут быть получены в течение короткого времени, решение дру-

гих проблем требует более длительного периода культивирования. При использовании метода сгустка плазмы продолжительность культивирования не превышает, как правило, 4 нед [33].

4. Техника одиночного предметного стекла (метод Максимова)

Это модификация метода часовых стекол, предложенного Феллом и Робисоном [6]. В основе его лежит также техника двойных покровных стекол, при которой клетки растут на сгустке экстракта и плазмы [34]. Этот метод был успешно приспособлен Харди [35] для онтогенетических исследований эмбриональных органов и их зачатков (рис. 7.4). Харди рекомендовал этот

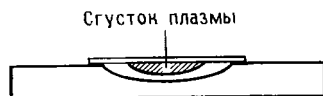


Рис. 7.4. Метод висячей капли (Максимова) по Харди, 1978 [35].

метод исследователям с ограниченными бюджетом и инструментальным обеспечением исследований, а также когда главной целью исследования является изучение изменения морфогенеза или мерцательной и секреторной активностей. Все эти изменения могут быть обнаружены с помощью обычного светового микроскопа или светового микроскопа с поляризационной или ультрафиолетовой оптикой.

4.1. Материалы

Помимо материалов, указанных в разд. 3, требуются следующие материалы.

Предметные стекла 75×45 мм с лункой глубиной 6—7 мм.

Покровные стекла № 3 (40×48 мм).

Пинцет для покровных стекол.

Лезвие безопасной бритвы и скальпель.

Вазелин и парапласт (4 части парапласта смешиваются с 1 частью вазелина для приклеивания покровных стекол к камерам).

Тонкая кисточка из натуральной щетины для нанесения смеси парапласта с вазелином.

4.2. Приготовление культуры

- I. Используя тонкие ножи и анатомические иглы, разделите орган или зачаток на кусочки соответствующего размера (не превышающие 2×1 , 5×1 мм) в растворе Хэнкса.

- II. Используя пинцет для покровных стекол, поместите покровное стекло размером 40×48 мм в чашку Петри.
- III. С помощью пастеровской пипетки нанесите три капли плазмы кур на центр стекла. Перемешайте плазму стеклянной палочкой так, чтобы она образовала круг диаметром 25 мм.
- IV. Второй пипеткой добавьте одну каплю экстракта куриных эмбрионов (50%) к плазме и быстро и тщательно перемешайте стеклянной палочкой.
- V. После образования сгустка поместите 1—3 эксплантата на сгусток. Лучше, чтобы стромальная поверхность эксплантата была обращена к сгустку.
- VI. Перенос эксплантатов осуществляйте с помощью скальпеля или пипетки с широким носиком. В последнем случае засосите в пипетку эксплантаты с раствором Хэнкса и перенесите на сгусток. Избыток раствора Хэнкса удалите капиллярной пипеткой.
- VII. Переверните покровное стекло со сгустком и эксплантатами, используя пинцет для покровных стекол, и установите его над лункой предметного стекла Максимова. Заклейте камеру тремя слоями смеси парапласт/вазелин, прогретой до 60°C .
- VIII. Инкубируйте камеры на предметном стекле при определенной температуре.

4.3. Смена среды

- I. Приготовьте свежий сгусток по описанной ранее методике. Удалите парафиновое уплотнение с помощью прогретого скальпеля или безопасной бритвы.
- II. Переверните покровное стекло на столик бинокулярной лупы. С помощью тонкого пинцета и анатомических игл отделите эксплантаты от сгустка и перенесите их в лунку предметного стекла для промывки раствором Хэнкса (две смены раствора по 5 мин).
- III. Перенесите каждый эксплантат на свежий сгусток. Установите перевернутое покровное стекло над лункой стекла Максимова и заклейте камеру, как указывалось выше.

Как было показано Харди [35], этот метод применим для изучения роста волос и дифференцировки кожи мышинных эмбрионов [36], действия гормонов на влагалище новорожденных мышей [37], дифференцировки гонад у мышинных эмбрионов [38].

Метод менее пригоден для высокоподвижных тканей, таких как эмбриональный кишечник или органы с высокой секреторной активностью. Он позволяет проводить анализ живых экс-

плантатов с помощью световой микроскопии, но изображения получаются не очень контрастными, а достаточно большая толщина ткани не позволяет применять фазовый контраст.

5. Техника агарового геля

Этот метод, лишенный многих недостатков, типичных для плазменного сгустка, позволяет избежать разжижения сгустка и дает возможность использовать химически определенные среды. Впервые техника агарового сгустка была предложена Спраттом [10], который использовал 3%-ный агаровый гель на растворе Рингера, а впоследствии 4%-ный гель, содержащий забуференный бикарбонатом солевой раствор, глюкозу, 11 аминокислот, 10 витаминов и агар [11]. Вольф и Хаффен модифицировали метод Гейларда [9] для изучения развития и дифференцировки органов или зачатков органов амфибий, птиц и млекопитающих. Они использовали агаровый гель в эмбриологическом часовом стекле. Первоначально предложенная ими среда состояла из 1%-ного агара, растворенного в растворе Гэя с 50%-ным экстрактом куриных эмбрионов и раствором Тироде. В более поздних модификациях в агар добавлялась куриная или лошадиная сыворотка либо эмбриональный экстракт заменялся на некоторые аминокислоты и витамины [39].

Вольфф [40] обнаружил что некоторые зачатки эмбриональных органов инкапсулируются клетками, мигрирующими с раневой поверхности эксплантатов. Для предотвращения этого процесса он заворачивал ткани в кусочки вителлиновой мембраны, выделенной из куриных яиц.

Метод был также применен к изучению роста опухолей. Вольфф с сотрудниками [41] добились роста опухолевых клеток человека из перевиваемых линий, а также из свежих опухолей на агаровом геле, ассоциированном с мезонефросом кур, или на геле, содержащем диализат печени кур.

Этот метод все еще находит широкое применение, хотя состав агарового геля претерпел значительные изменения и многие авторы для растворения агара используют не солевые растворы, а химически определенные среды.

В разд. 5.1 приведена модификация метода, использующая такую определенную среду.

5.1. Техника эмбриологических часовых стекол

5.1.1. Материалы

Эмбриологические часовые стекла с внешним диаметром 3,9 см и внутренним диаметром 3,5 см (рис. 7.5).

Стекланные крышки диаметром 3,9 см для покрывания часовых стекол.

Парафин, прогретый до 60°C , для приклеивания крышки к часовому стеклу.

Маленькая кисточка из натуральной щетины для смазывания крышки парафином.

2%-ный агар Гибко.

Среда 199 Моргана, Мортон и Паркера на солевом растворе Хэнкса (двукратная).

Среда 199 (однократная) на растворе Хэнкса.

Эмбриональная сыворотка или сыворотка новорожденных телят, инактивированная при 56°C в течение 30 мин.

Раствор Хэнкса.

Пастеровские пипетки.

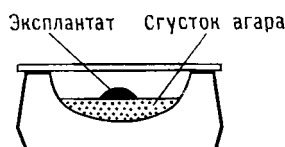


Рис. 7.5. Эмбриологическое часовое стекло с агаровым сгустком. Вольфф и Хаффен, 1952 [12].

Пипетки с широким кончиком.

Капиллярные пипетки, получаемые путем оттягивания кончиков пастеровских пипеток над пламенем.

Держатель пипеток.

Катарактные ножи.

Часовые пинцеты, изогнутые тонкие ножницы, анатомические иглы.

Стекланные пластинки с площадью поверхности около 8 см^2 для препарирования органов.

5.1.2. Приготовление агарового геля

- I. Нагрейте 2%-ный агар в водяной бане при 90°C до разжижения и затем быстро смешайте в стеклянной пробирке с равным объемом двукратной среды 199. Храните полученный агар при 37°C .
- II. После перемешивания поместите 0,5 мл 1%-ного агара на дно часового стекла, добавьте 0,1 мл эмбриональной сыворотки или сыворотки новорожденных телят и 0,4 мл среды 199. Быстро и тщательно перемешайте, избегая преждевременного сгущения. Образование геля в смеси начинается при 36°C и окончательное затвердевание — при 30°C .

При необходимости получения меньшего количества геля пропорции агара, сыворотки и среды 199 должны сохраняться.

В экспериментах, направленных на изучение действия гормонов или других агентов, эти вещества должны вводиться в гель путем растворения их в однократной среде 199.

5.1.3. Эксплантация

- I. Отделите от эмбрионов органы или зачатки органов, используя бинокулярную лупу. В ходе препарирования поддерживайте влажность эмбрионов с помощью раствора Хэнкса, содержащего 2% сыворотки.
- II. Перенесите предназначенные для культивирования ткани в лунку предметного стекла и промойте их раствором Хэнкса.
- III. Перенесите ткани на агаровый гель с помощью двух катарактных ножей или путем осторожного отсасывания раствора Хэнкса с кусочками ткани в пипетку с широким носиком и нанесения на гель.
- IV. С помощью двух анатомических игл сориентируйте эксплантаты на агаре и отсосите избыток жидкости капиллярной пипеткой. Обычно на каждом геле устанавливается по одному эксплантату. Оптимальный размер эксплантата $1,5 \times 1,5 \times 10$ мм, а максимальный размер $2 \times 2 \times 1,5$ мм. Однако, если ткань очень тонкая (тоньше 0,5 мм), размеры эксплантата могут быть больше.
- V. С помощью тонкой кисточки наклейте стеклянную крышку на камеру, используя по крайней мере 2 слоя теплого парафина (60°C). Перенесите камеры в термостат и инкубируйте при 37°C или другой заданной температуре. Желательно не ставить камеры непосредственно на металлические полки, а использовать деревянные прокладки.

Многие эксперименты, связанные с изучением морфогенетических изменений и дифференцировки клеток, не требуют длительного культивирования, и ответы на поставленные вопросы могут быть получены в течение 3—7 дней. В этих случаях можно не менять среду. Если эксперимент требует более продолжительного культивирования, то следует переносить эксплантаты на свежий агаровый гель каждые 5—7 сут. Свежий гель делается в новой камере при соблюдении тех же пропорций агара, сыворотки и среды.

Удалите крышку с эмбриологического часового стекла старой культуры, используя прогретые бритву или скальпель. Снимите эксплантаты со старого геля, применяя два катарактных ножа или катарактный нож и анатомическую иглу, и промойте эксплантаты раствором Хэнкса в лунке предметного стекла. Перенесите эксплантаты на новые гели и заклейте часовые стекла свежими стерилизованными стеклянными крышками, используя маленькую кисточку и парафин.

Жизнеспособность эксплантатов и макроскопические изменения можно контролировать, просматривая препараты при дневном свете или с помощью источника света от бинокулярной лупы. Здоровые и растущие ткани обычно кажутся прозрачными, поверхность их выглядит блестящей. Наличие затенений свидетельствует о потере жизнеспособности или о начинающихся в тканях некрозах.

Модификация, при которой солевой раствор был заменен химически определенной средой, дала возможность изучать индукцию тестостероном развития предстательной железы из уrogenитального синуса в эмбрионах мышей и крыс и роль мезенхимы в этом процессе [42, 43]. Агар обеспечивает развитие предстательной железы из целого синуса и из его компонентов (эпителия и мезенхимы), разделенных и реассоциированных друг с другом в различных сочетаниях.

6. Культура эмбрионов для тератологических исследований

Нью [44, 45] и Кокрофт [46] разработали метод, позволяющий выращивать в культуре целых эмбрионов мышей и крыс. Эмбрионы на ранних преимплантационных стадиях развития более пригодны к культивированию *in vitro*, чем эмбрионы поздних сроков [44]; последние, однако, больше подходят для проведения тератологических исследований, поскольку они чувствительнее к токсическим агентам.

В соответствии с этим Нью и Кокрофт выбрали эмбрионы на двух последних стадиях беременности: 9,5 сут и 11,5 сут. Девятисуточные эмбрионы состоят из пресомитного цилиндра длиной 1,5 мм и диаметром 0,6 мм. Эмбрионы в возрасте 11,5 сут содержат 27—31 сомитов и имеют длину 3—3,8 мм.

6.1. Получение эксплантатов

Удалите матку беременного животного, поместите в солевой раствор и откройте ее с анти-мезометриальной стороны. Изъятие плода осуществляйте с помощью катарактного ножа. После переноса в свежий раствор удалите материнскую децидуальную оболочку и вскройте мембрану Рейхерта. Эктоплацентарный конус или аллантоис у более взрослых эмбрионов остаются связанными с эмбрионами, которые теперь готовы к помещению в культуральные камеры.

Используются два типа культуральных камер.

1. *Цилиндрические бутылки на 60 мл.* Они частично заполняются средой и газовой смесью. Бутылки укладывают горизонтально на роллеры и вращают со скоростью 30—60 об/мин.

В ходе инкубации эмбрионы максимально доступны и среде, и растворенным в ней агентам.

II. *Ротатор*. Небольшие культуральные сосуды прикрепляются к полюму вращающемуся барабану, через который постоянно пропускают газовую смесь. Это обеспечивает постоянство содержания CO_2 и кислорода при минимальных изменениях pH среды.

6.2. Газовая смесь

Для эмбрионов в возрасте 9,5 сут в течение первых 24 ч культивирования наиболее пригодна газовая смесь, состоящая из 5% CO_2 , 5% O_2 и 90% N_2 . При последующем культивировании газовая смесь должна содержать 5% CO_2 , 20% O_2 и 75% N_2 .

Для эмбрионов в возрасте 11,5 сут пригодна газовая смесь из 5% CO_2 и 95% O_2 в течение всего периода культивирования.

6.3. Среда

В качестве среды используется сыворотка крыс, получаемая от доноров под эфирной анестезией. Результаты оказываются лучше, если кровь центрифугировать немедленно после выделения и до формирования сгустка. Образующийся в супернатанте сгусток слегка отжимают для высвобождения попавшей в него сыворотки. После повторного центрифугирования сыворотку собирают и хранят при -10°C . Перед использованием сыворотку размораживают, инактивируют при 56°C в течение 30 мин; через нее продувают воздух для удаления остаточного эфира и центрифугируют для удаления вновь образованных сгустков фибрина.

6.4. Схема эксплантации

Шесть эмбрионов в возрасте 9,5 сут помещают в бутылку объемом 60 мл с 6 мл сыворотки. Три эмбриона в возрасте 11,5 сут помещают в бутылку с 9 мл сыворотки и оба типа эмбрионов инкубируют при $37-38^\circ\text{C}$. Эксплантированные эмбрионы свободно плавают в сыворотке или помещаются на покрытую коллагеном ткань, прикрепленную к покровному стеклу.

Значительная часть эмбрионов хорошо развивается в культуре. Более молодые эмбрионы образуют 25—28 сомитов, и содержание в них белка увеличивается; характер этих изменений близок к таковому, наблюдаемому при развитии *in vivo*. Эмбрионы в возрасте 11,5 сут развиваются несколько медленнее,

чем *in vivo*, но и в них количество сомитов увеличивается и содержание белка также повышается. Закрепленные эмбрионы можно наблюдать в ходе культивирования, следить за их развитием, а также исследовать влияние токсических агентов на нормальное развитие эмбрионов. Этим методом было успешно изучено влияние CO_2 , избытка глюкозы и гипертермии [46]. Метод в равной степени пригоден для изучения влияния и других веществ на развитие эмбрионов.

7. Техника сеток

Этот метод сочетает использование жидкой химически определенной или полупределенной среды с твердой опорой эксплантированной ткани, предотвращающей ее погружение в среду, приводящее к кислородной недостаточности. Важность кислорода для роста взрослых тканей была выявлена Троувеллом,

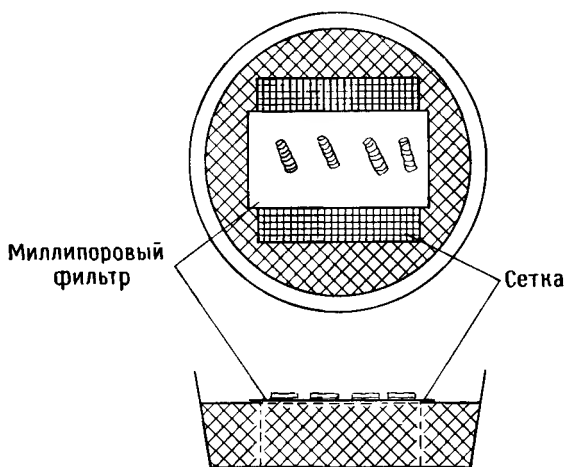


Рис. 7.6. Модифицированный метод Троувелла.

создавшим аппарат, в котором культивируемый эксплантат на сетке заключается в камеру с атмосферой двуокиси углерода и кислорода [17—19]. Использование металлической сетки для поддержания культур в жидкой среде сохранилось до настоящего времени, но исходная газовая камера, предложенная Троувеллом, претерпела существенные модификации и упрощения.

Модифицированный метод Троувелла в настоящее время широко используется для эмбриональных и взрослых тканей. Ниже приведено его описание (рис. 7.6 и 7.7).

7.1. Материалы

Стерильная дистиллированная вода или раствор Хэнкса.

Чашки Петри диаметром 91 мм.

Кружки фильтровальной бумаги, соответствующие размерам дна чашек Петри с двумя круглыми отверстиями диаметром 3,5 см.

Пластиковые культуральные камеры диаметром 32 мм (Sterilin)

Бумага для чистки оптики (Gurr, London), обезжиренная эфи-

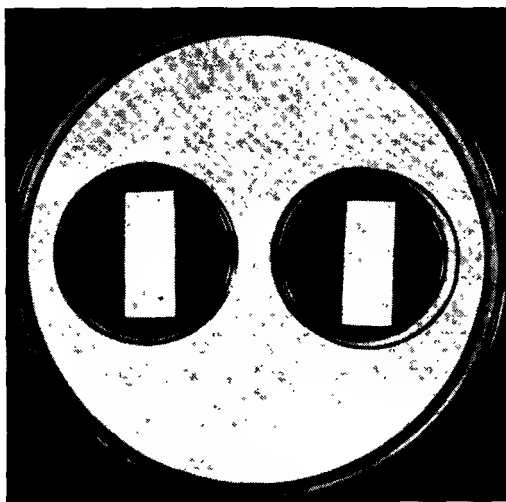


Рис. 7.7. Модифицированный метод Тривелла. Чашка Петри с камерами для клеток, сетки и полоски миллипоровых фильтров.

ром и спиртом (метод подготовки бумаги приведен в разд. 7.1.1). Миллипоровые фильтры с диаметром пор 0,5 мкм (Millipore Corp., Bedford, MA, USA), нарезанные перед стерилизацией на полоски размером $1 \times 2,2$.

Вместо миллипоровых фильтров можно использовать поликарбонатные мембраны (Nucleopore Sterilin). Они прозрачны, не содержат детергентов, поэтому эксплантаты, растущие на таких мембранах, можно осматривать в ходе культивирования. Таким способом можно культивировать целые органы, например эмбриональные молочные железы. Ткань можно фиксировать и исследовать непосредственно на мембранах, что позволит избежать приготовления срезов.

Сетки из листового металла (Expanded Metal Co., Harlepool, UK), (площадь поверхности 18 мм^2 , высота 4 мм) вырезаются ножницами из листов большего размера. Края сеток загибают-

ся вниз, образуя скамейку или столик. После использования погрузите металлическую сетку в концентрированную азотную кислоту и оставьте там на 24—48 ч. Затем промойте сетку проточной водопроводной водой в течение 24 ч. Трижды ополосните дистиллированной водой и высушите в сушильном шкафу. Азотная кислота может быть использована несколько раз.

Среда 199 на солевом растворе Эрла.

Среда 199 на солевом растворе Хэнкса (поддерживающая среда).

Инсулин (Sigma).

Сыворотка новорожденных телят, инактивированная нагреванием.

Универсальные контейнеры (стеклянные или пластиковые) емкостью 20 мл.

Бутыли Биджу стеклянные, емкостью 5 мл.

Градуированные пипетки.

Подставки для пипеток.

Пастеровские пипетки.

Пенициллин (Glaxo).

Стрептомицин (Glaxo).

Фунгизон (Flow Laboratories, Irvine, UK).

2 пары прямых пинцетов длиной около 10 см.

2 пары прямых ножниц длиной около 10 см.

2 пары прямых тонких ножниц.

2 пары часовых пинцетов № 3 или 4 (Weiss, London, UK).

2 катарактных ножа.

2 ножа Сванн-Мортон № 10, перед использованием обезжирить абсолютным этанолом.

Предметные стекла с лункой.

Стеклянная пластинка площадью 8 см² для препарирования.

70%-ный этанол.

Лоток из нержавеющей стали.

Анаэробный сосуд Макинтоша и Филдса (модифицированный).

Газовый баллон, содержащий смесь 5% CO₂ и 95% кислорода.

7.1.1. Подготовка бумаги для чистки оптики к культивированию

Такая бумага обычно покрыта слоем жира, который должен быть удален перед использованием.

I. Разрежьте бумагу на кусочки размером примерно 5×8 см и поместите их в чашку Петри.

II. Залейте эфиром на 1 ч, затем смените эфир и оставьте еще на 1 ч.

III. Удалите эфир и залейте на 1 ч абсолютным этанолом. Смените абсолютный этанол и оставьте еще на 1 ч. Удалите абсолютный этанол и 8—10 раз промойте перегнанной в стекле дистиллированной водой. Оставьте бумагу в ди-

стиллированной воде на ночь. Высушите в сушильном шкафу (37°C).

- IV. Перед использованием нарежьте полоски нужного размера и простерилизуйте сухим жаром или в автоклаве.

7.2. Получение эксплантатов

- I. Прежде чем начинать препарировать орган, соберите аппаратуру, необходимую для культивирования, и приготовьте среду.
- II. Три слоя фильтровальной бумаги, вставленной перед стерилизацией в чашки Петри, смочите 10 мл дистиллированной воды или раствора Хэнкса.
- III. Поместите две пластиковые культуральные камеры в прорезанные в бумаге отверстия в каждой чашке и установите в камеры металлические сетки.
- IV. Заполните дополнительную чашку Петри средой 199 (на солевом растворе Хэнкса), содержащей 2% телячьей сыворотки для промывки и увлажнения ткани перед и в течение препарирования.

Процедура препарирования существенно меняется при работе с разными тканями. Ниже подробно рассмотрено препарирование предстательной железы, трахеи и кожи.

7.2.1. Предстательная железа

Получение ткани от мышей и крыс в возрасте от 6 нед до 6 мес.

- I. Зафиксируйте животное булавками на корковой подложке и тщательно промойте шкурку 70%-ным этанолом.
- II. Вскройте кожу на брюшке парой прямых ножниц, делая один горизонтальный и два вертикальных разреза. Зафиксируйте оттянутую полоску кожи булавками, обнажив область около мочевого пузыря.
- III. Поднимите мочевой пузырь часовым пинцетом и перережьте его связку с подлежащими мышцами. Обнажите лежащую ниже предстательную железу. Вы узнаете ее по блестящей, «перламутровой» поверхности.
- IV. Оттяните предстательную железу часовым пинцетом и отрежьте от основания пузыря тонкими ножницами.
- V. Промойте железу ледяной средой, перенесите в лунку предметного стекла с той же средой и держите там до начала препарирования. Для одной группы экспериментов требуется не менее 6 желез.
- VI. Перенесите железы на стеклянную пластинку для препарирования.

- VII. Очистите железы от окружающих жировой и соединительной тканей с помощью пары ножей Сванн-Мортон.
- VIII. Разделите две доли железы, перерезав соединительную ткань между ними.
- IX. Проведите дальнейшее препарирование, не разрезая доли (что может привести к регенеративной гиперплазии раневых поверхностей), а разделяя слабым надавливанием на меньшие дольки. Эти маленькие дольки размером $2 \times 2 \times 2$ мм готовы к дальнейшей эксплантации.
- Следите за тем, чтобы в ходе препарирования ткань не высохла; она может приклеиться к стеклу.

7.2.2. Трахея

Получение ткани от мышей и крыс в возрасте 2—5 сут.

- I. Зафиксируйте животное булавками на небольшой корковой подложке и тщательно промойте шкурку 70%-ным этанолом.
- II. Вскройте тонкими ножницами кожу и грудную клетку, оттяните ребра и обнажите трахею. Ее легко выявить по хрящевым кольцам.
- III. Освободите трахею с помощью двух часовых пинцетов. Один пинцет поддерживает орган, а второй отделяет его от лежащего ниже пищевода путем возвратно-поступательных движений.
- IV. После отделения приподнимите трахею часовым пинцетом и отрежьте тонкими ножницами.
- V. Сполосните орган ледяной средой, перенесите в лунку предметного стекла с той же средой и держите там до начала препарирования.
- VI. Перед эксплантацией перенесите трахеи на стеклянную пластинку, отрежьте проксимальный и дистальный концы и разрежьте пополам с помощью пары ножей Сванн-Мортон. Полученные половинки длиной около 1,5—2 см экспантируются в виде трубочек.

7.2.3. Кожа

Ткань обычно получают от крысиных или мышинных эмбрионов в возрасте 17—18 сут.

- I. Зафиксируйте эмбрионы с помощью булавок на небольшой корковой подложке и смочите их кожу холодной средой.
- II. С помощью пинцета и тонких ножниц удалите кожу с брюшка *in toto*, ополосните ее холодной средой и перенесите на стеклянную пластинку. Во время этого процесса кожа сокращается и стремится к скручиванию, так что

в ходе препарирования ее нужно время от времени разглаживать.

- III. В случае необходимости соскоблите подкожный жир, чтобы препарат состоял из двух главных слоев: собственно кожи и эпидермиса.
- IV. Разделите препараты на фрагменты размером $3 \times 3 \times 4$ мм с помощью двух ножей Свани-Мортонa.

7.3. Среда

Изучалась эффективность различных сред в поддержании структуры и функции эксплантированных органов, в том числе среды Ham F-12, среды Waumouth 752/1, среды CMRL 1066, среды 199 и среды Trowell T8.

Среда Trowell оказалась пригодной только для относительно короткого культивирования взрослой ткани. Кроме того, эта среда содержит большое количество инсулина (50 мкг/мл), что может мешать действию гормонов и маскировать эффекты других ростовых факторов. По этим причинам среда не нашла применения.

Между другими средами не обнаружили существенных различий, так что, как правило, можно использовать среду 199 либо без добавок, либо с добавлением сыворотки и небольшого количества инсулина.

Рекомендуется использовать среду следующего состава:

Среда 199 на растворе Эрла.

Сыворотка новорожденного теленка, инактивированная нагреванием (в концентрации 5% при изучении действия гормонов и 10—15% при изучении канцерогенеза).

Инсулин (0,5—1,0 мкг/мл).

Антибиотики и противогрибковые агенты: пенициллин (250 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), фунгизон (1,4 мкг/мл).

7.4. Эксплантация

- I. Поместите полоски бумаги для чистки оптики или миллипоровые фильтры на стеклянное предметное стекло или дно чашки Петри и смочите их 1—2 каплями среды.
- II. Перенесите 6—8 фрагментов предстательной железы или 4 половинки трахей на полоски с помощью двух катарактных ножей. Для предстательной железы взрослых животных лучше использовать бумагу, а миллипоровые фильтры — для трахей новорожденных. При отсутствии бумаги можно работать с миллипоровыми фильтрами и при культивировании предстательной железы.
- III. Перенесите полоски с эксплантатами на сетки в культуральные камеры с помощью часовых пинцетов и заполни-

те камеры примерно 3 мл среды; среда должна доходить до верхнего уровня сеток и обеспечивать смачивание поверхности эксплантата, не допуская его погружения в среду.

Эксплантация кожи оказывается более сложной процедурой из-за того, что эксплантат иногда закручивается. Это можно преодолеть, придавливая дермальную сторону эксплантата смоченными полосками миллипорового фильтра. Препарат расправляется и слегка приклеивается к субстрату. Перед переносом на сетки полоски переворачивают, так что рост эксплантата кожи происходит при обращении эпидермиса наружу.

Соединения, действие которых предстоит исследовать, добавляют в среду до желаемой концентрации на этой стадии эксплантации. Впрочем, они могут быть внесены в среду раньше и затем храниться при -20°C вплоть до использования. Последний вариант обеспечивает более жесткий контроль экспериментальных условий и оказывается менее трудоемким.

7.5. Инкубация и перфузия

- I. Установите чашки Петри, содержащие по две культуральные камеры, на лотки из нержавеющей стали и разместите их в анаэробном сосуде Макинтоша и Филдса (Bairdand Tatlock Ltd., London, UK) (рис. 7.8), модифицированном Фэйнстатом [47]. Из сосуда удалены средства анаэробного контроля, и крышка снабжена двумя вентилями.
- II. Поместите сосуд в термостат и соедините с газовым баллоном с помощью силиконовой трубки, проходящей через небольшое отверстие в верхней части термостата.
- III. Пропускайте через сосуд смесь 5% CO_2 и 95% кислорода, используя стерильный фильтр. При культивировании предстательной железы взрослых животных продувание газовой смесью продолжайте в течение 25 мин со скоростью 150 мл/мин. При культивировании трахей новорожденных и кожи продувайте смесь 20 мин со скоростью 125 мл/мин. Контролируйте скорость потока газовой смеси и ее состав с помощью специального измерителя.
- IV. Плотно закупорьте сосуд, так чтобы концентрация газовой смеси внутри оставалась постоянной вплоть до открывания сосуда при смене среды.
- V. Инкубируйте культуры при $37,5^{\circ}\text{C}$.

Смесь 5% CO_2 и 95% кислорода оказалась пригодной для культивирования предстательных желез, трахей и кожи; появление центральных некрозов, которые могут возникнуть при культивировании в атмосфере воздуха, предотвращается. Одна-

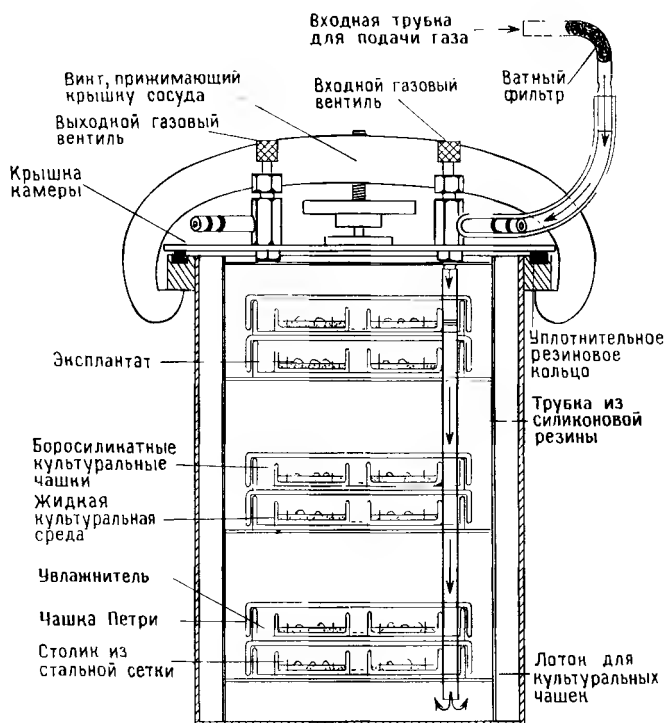


Рис. 7.8. Модифицированный анаэробный сосуд Макинтоша и Филдса для создания газовой фазы культуры.

ко при культивировании других тканей более низкое содержание кислорода (но превышающее его концентрацию в воздухе) может оказаться столь же эффективным.

7.6. Смена среды

Среда меняется каждые 2—3 дня.

- I. Выньте из сосуда Макинтоша чашки Петри с культурами.
- II. Пастеровскими пипетками отсосите старую среду из чашек и замените ее на такое же количество новой среды. Культуральные камеры должны оставаться в тех же чашках Петри, если период культивирования относительно короток. При более длительном культивировании рекомендуется переносить камеры в новый набор стерильных чашек Петри, увлажненных стерилизованной водой или раствором Хэнкса.
- III. После смены среды вновь поставьте чашки Петри с культуральными камерами в сосуд Макинтоша.

IV. Сосуд опять должен быть плотно закрыт и продут той же газовой смесью, что и раньше.

Техника сеток нашла успешное применение при изучении роста и дифференцировки эмбриональных и взрослых тканей, действия стероидных гормонов на их органы-мишени и взаимодействия канцерогенов и конденсата табачного дыма с витамином А.

Исследования культивируемых предстательных желез крыс показали, что этот орган остается андроген-зависимым, отвечающим на гормон *in vitro*, и что в этих условиях ткань может метаболизировать тестостерон до активного андрогена (дигидротестостерона). Это было показано с помощью хроматографического анализа стероидов ткани и культуральной среды [48]. В органной культуре может хорошо поддерживаться доброкачественная гиперплазия предстательной железы человека [49]; было показано, что тестостерон стимулирует синтез РНК в эпителии и строме эксплантата [50]. Использование техники сеток позволило культивировать в течение длительного периода мочевой пузырь крысы и человека; при этом было показано, что уротелий дифференцируется *in vitro* таким же способом, как и *in vivo* [51, 52].

В предстательных железах мышей и крыс, эмбриональных легких мыши и человека и трахеях плодов и новорожденных крыс канцерогенные углеводороды и конденсат табачного дыма при кратковременном воздействии индуцировали предраковые изменения. Этот эффект мог быть подавлен витамином А и его структурными аналогами [53—56].

8. Длительное культивирование взрослых тканей человека

Многие методы органной культуры обеспечивают рост и дифференцировку эксплантированного органа *in vitro* только в течение ограниченного периода времени. Часто решение какой-либо проблемы может быть достигнуто в течение дней или недель культивирования, но в других случаях требуется более долгий период поддержания органной культуры. Такая необходимость возникает, в частности, при изучении канцерогенеза тканей человека, требующего длительного воздействия канцерогенных агентов.

Исходя из этих задач, был разработан метод культивирования, согласно которому ткань человека попеременно подвергается воздействию жидкой среды и соответствующей газовой фазы. С помощью этого метода можно поддерживать рост и дифференцировку ткани в культуре в течение продолжительного времени.

Такой метод был использован для культивирования бронхов [20], молочной железы [21], пищевода [22] и шейки матки [23].

8.1. Эксплантация и культивирование

- I. Образцы тканей могут быть получены путем аутопсии либо при проведении хирургической операции. Органы должны быть освобождены от окружающей ткани и доставлены в лабораторию погруженными в ледяную среду Лейбовича. С равным успехом может быть использована и другая среда при условии, что в ней поддерживается постоянный рН. Для предотвращения бактериального заражения в эту среду рекомендуется добавлять антибиотики; в лаборатории ткань следует промывать в такой же среде. Антибиотики нужно использовать в концентрации, вдвое превышающей таковую при культивировании ткани (например, 200 ед./мл пенициллина и 200 мгк/мл стрептомицина).
- II. Проведите дальнейшую подготовку ткани, освободите ее от жира, стромы и подлежащих мышц и разрежьте на фрагменты подходящих для культивирования размеров. Эти размеры оказываются разными для разных тканей. Так, эксплантаты бронхов имеют размер 2 см², молочной железы и шейки матки 0,5—1 см², а пищевода 1 см².
- III. Поместите эксплантаты на дно пластиковой чашки Петри для культуры ткани (60 мм), к которому они приклеиваются, и залейте 3—5 мл среды. Органы, содержащие эпителий и строму, располагайте таким образом, чтобы стромальная сторона приклеивалась ко дну, а свободная поверхность была представлена эпителием.

Количество эксплантатов на чашку варьирует в зависимости от типа ткани и желания исследователя. Можно выращивать в каждой чашке 6—9 эксплантатов шейки матки, 2—6 эксплантатов молочной железы и 6—18 эксплантатов пищевода. Эти цифры не являются абсолютными, и другие исследователи могут выбрать для своих опытов как другие размеры эксплантатов, так и другое их количество на чашку.

8.2. Среда

Наиболее подходящей для длительного поддержания тканей человека в органной культуре оказалась среда CMRL 1066, в которую обычно добавляются эмбриональная телячья сыворотка, гормоны и антибиотики. Рекомендуется следующий состав среды.

Среда CMRL 1066 (Gibco).

5% эмбриональной телячьей сыворотки, инактивированной нагреванием.

2—4 мМ L-глутамин.

Бычий инсулин (1 мкг/мл) (см. табл. 7.1).

Гемисукцинат гидрокортизона (0,1 мкг/мл) (см. табл. 7.1) (Sigma)

Таблица 7.1. Долгоживущие культуры тканей человека

Продолжительность культивирования (мес)		Результаты
Бронхи [20]	4	После 6 нед снижение высоты цилиндрического эпителия. Частичная потеря бокаловидных клеток, частичная метаплазия.
Молочная железа [21]	6	Сохраняются лобулярное строение и типичный эпителий протоков. Сохраняется секреторная активность с изменениями, связанными с менструальным циклом.
Пищевод [22]	4	Сохранение признаков чешуйчатого эпителия подтверждается световой и электронной микроскопией.
Шейка матки [23]	5	Жизнеспособность эпителия подтверждается результатами анализа ультраструктуры и митотической активности. После 4 нед отмечается частичная потеря секрета слизи и очаговая метаплазия

Инсулин является ростовым фактором, и в экспериментах, в которых единственным критерием эффекта служит изменение пролиферации клеток, инсулин может маскировать эффект. Поэтому в таких экспериментах рекомендуется не использовать инсулин или снижать его концентрацию (например, до 10 нг/мл).

Гидрокортизон в рекомендуемых концентрациях (0,1 мкг/мл) подавляет действие канцерогенных агентов [57] и, следовательно, непригоден при изучении канцерогенеза. В этих случаях он должен быть удален из среды или его концентрация снижена в 20 раз.

Пенициллин (100—300 ед./мл) (Glaxo).

Стрептомицин (100—300 мкг/мл) (Glaxo).

Фунгизон (Squibb) (5 мкг/мл) или гентамицин (Schering) (100 мкг/мл).

Для культивирования гормон-зависимых органов в среду следует добавлять специфические гормоны (так, для молочной железы прогестерон, эстрадиол, альдостерон и пролактин добавляются в среду постоянно или в течение 28 сут для имитации менструального цикла [21]).

8.3. Инкубация

Эксплантаты инкубируются при температуре 36,5 °C.

- I. Разместите чашки с эксплантатами и 3,5 мл среды на индивидуальные лотки и установите лотки в камеру с контролируемой атмосферой (Bellco). На каждом лотке можно разместить до 60 чашек.

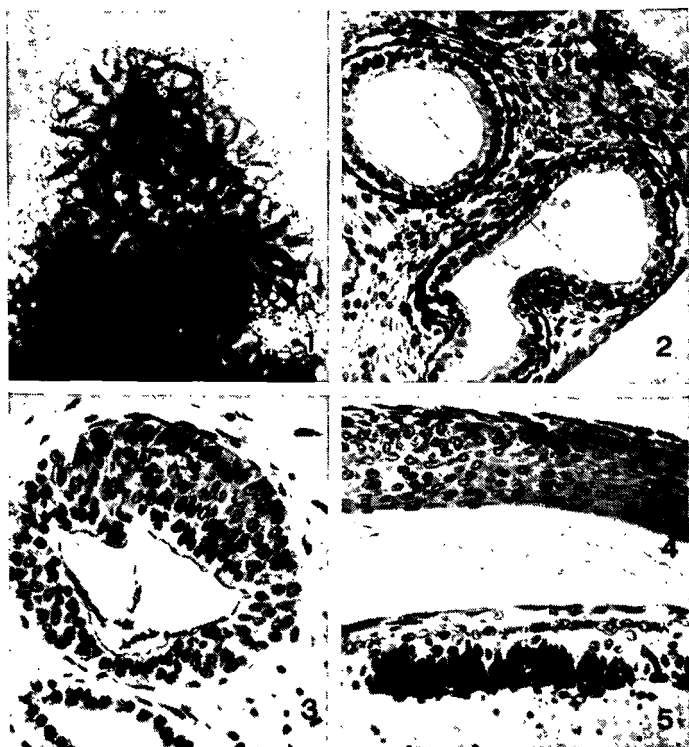


Рис. 7.9. Легкое эмбриона человека. Влияние 3,4-бензпирена. 1 — Живая культура легкого эмбриона человека после 2 нед роста в нормальной среде; виден организованный рост. Обратите внимание на вырастание новых бронхиол на краю эксплантата. Увеличение $19\times$. 2 — Бронхиолы при большем увеличении после 2 нед роста в контрольной среде. Азановое замещение. Увеличение $\times 243$. 3 — Индукция гиперплазии. Гиперпластические бронхиолы видны после 2 нед роста в присутствии 3,4-бензпирена. Видны мелкие плотно расположенные клетки и поверхностный слой секреторного эпителия. Гематоксилин-эозин. Увеличение $342\times$. Пищевод эмбрионов крыс. Слизистая трансформация эпителия витамином А. 4 — Пищевод, выращиваемый в течение 1 нед в контрольной среде. Обратите внимание на толщину эпителия и кератиновые волокна. Окраска ШИК после гидролиза эластазой. Увеличение $281\times$. 5 — Пищевод, выращиваемый в течение 1 нед при избытке витамина А. Кератин отсутствует. Сформировались бокаловидные клетки, содержащие слизь. Окраска муцикармином. Увеличение $281\times$.

- II. Продуйте камеру газовой смесью (5% CO_2 , 45% O_2 , 50% N_2).
- III. Поместите камеру на качающуюся платформу и установите скорость качаний в пределах от 3 до 10 в мин в зависимости от типа культивируемой ткани. В результате будет

происходить чередующееся омывание поверхности эксплантатов.

Собранный блок помещается в большинство стандартных термостатов.

8.4. Смена среды

Среду меняют два или три раза в неделю и после каждой смены среды камеру продувают газовой смесью, устанавливают на качающуюся платформу и вновь помещают в термостат.

Использование этой техники обеспечивает поддержание ткани в культуре в течение длительного периода при минимальных изменениях характера роста (табл. 7.1).

9. Подготовка органных культур для световой микроскопии

Приготовление гистологических срезов органных культур производится в основном стандартным способом; иногда снижается время обработки различными препаратами.

9.1. Материалы

Фиксатор Буэна или 3%-ный уксусный фиксатор Ценкера.

Набор растворов этанола (50%—100%).

1%-ный эозин в 70%-ном этаноле.

Кедровое масло.

Мягкий парафин, плавящийся при 45—56 °C (Raymond Lamb, Sunbeam Road, London).

Твердый парафин с точкой плавления 63 °C (Raymond Lamb, Sunbeam Road, London).

2 иглы.

2 катарактных ножа.

Стеклянные часовые стекла диаметром 5 см.

Пипетки с широким кончиком.

Нагревательный столик с пластинкой.

9.2. Фиксация и обезвоживание препаратов

- I. В конце периода культивирования выньте полоски с эксплантатами из среды и ополосните холодным раствором Хэнкса.
- II. Высушите на фильтровальной бумаге.
- III. Погрузите полоски с эксплантатами в фиксатор на 35—40 мин.
- IV. Если применялся фиксатор Буэна, проведите полоски через несколько смен 70%-ного этанола.

- V. После фиксатора Ценкера промойте препараты проточной водой в течение 1 ч, затем 1 ч — 50%-ным этанолом, 1 ч — 70%-ным этанолом, оставьте на ночь в 70%-ном этаноле и затем 1—1,5 ч обработайте 90%-ным этанолом.
- VI. Удалите эксплантаты с полосок, используя катарактные ножи.
- VII. Добавьте несколько капель 1%-ного эозина к 95%-ному этанолу. Перенесите эксплантаты в 95%-ный этанол с эозином и оставьте на 30 мин.
- VIII. Проведите через две смены абсолютного этанола по 1 ч в каждой. Перенесите препараты в кедровое масло на 1 ч, смените масло и оставьте на ночь. Утром проведите через мягкий парафин 1—1,5 ч и мягкий парафин 1,5—2 ч, а затем через 2 смены твердого парафина по 30 мин — 1 ч в каждой.

9.2.1. Заключение препаратов

- I. Нагрейте часовое стекло на нагревательном столике.
- II. Заполните стекло твердым парафином (не до краев).
- III. Перенесите на часовое стекло эксплантаты в парафине, используя пипетку с широким кончиком.
- IV. Сориентируйте эксплантаты в парафине с помощью двух игл до отверждения парафина. После отверждения поместите стекло с препаратами в холодную водопроводную воду. Это облегчит отделение парафинового блока от часового стекла.
- V. Установите блок в микротом и приготовьте серийные срезы толщиной 5—6 мкм.
- VI. Срезы выдерживайте до окрашивания не менее 1 дня.

9.3. Методы окрашивания

Перед окрашиванием срезы должны быть депарафинизированы ксилолом и обработаны серией этанолов с понижающейся концентрацией, вплоть до дистиллированной воды. *Примечание.* Поскольку пары ксилола токсичны и могут быть канцерогенными, работать с ним следует в вытяжном шкафу.

- I. Обработать каждый срез ксилолом в течение 5 мин.
- II. Сменить ксилол на свежий.
- III. На этом этапе убедитесь, что парафин полностью удален. Если нет, верните в ксилол до полного растворения парафина. Проводка: абсолютный этанол и 95%-ный этанол по 5 мин в каждом, 70%-ный этанол, 50%-ный этанол, дистиллированная вода.

9.3.1. Гематоксилин-эозин

Это стандартная окраска, благодаря которой получены основные результаты в области нормальной и патологической гистологии.

I. Схема окрашивания.

- а) Гематоксилин Эрлиха, 5—15 мин.
- б) Быстро промойте срезы дистиллированной водой.
- в) Удалите избыток красителя путем дифференцирования в подкисленном спирте (1%-ная соляная кислота в 70%-ном этаноле) в течение нескольких секунд. Под действием кислоты голубая окраска гематоксилина меняется на красную.
- г) Быстро промойте дистиллированной водой.
- д) Восстановите голубую окраску, промойте срезы в подщелоченной проточной воде в течение 5—15 мин при комнатной температуре. Окрасьте 1%-ным водным эозином в течение 1—3 мин.
- е) Удалите избыток краски дистиллированной водой, обезводьте спиртами и осветлите ксилолом, учитывая, что эозин отмывается дистиллированной водой и разбавленными спиртами, но плохо отмывается абсолютным этанолом. Степень окрашивания, таким образом, легко контролируется, и любое перекрашивание может быть устранено при проводке через разведенные спирты. Рекомендуется следующая продолжительность процедур: по 2—3 с — в 70%-ном и 90%-ном этаноле, 30 с — в абсолютном этаноле, 1—2 мин — в первой порции ксилола, 1—2 мин или более — во второй порции ксилола.

ж) Заключите в синтетическую смолу, например в DPX.

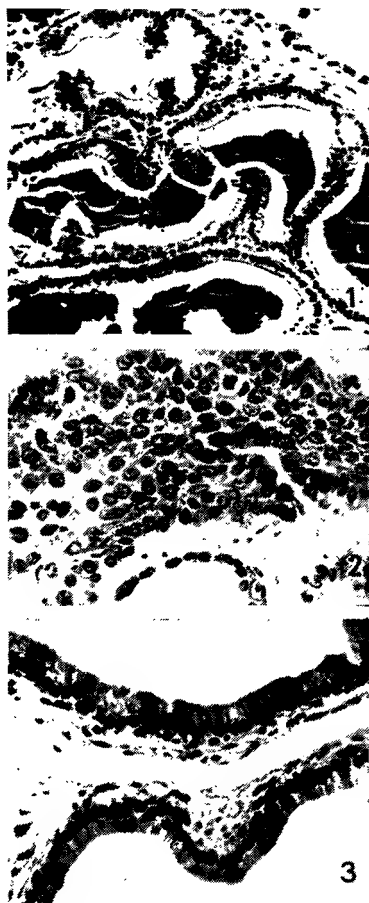
II. Результаты.

- а) Ядра — голубые, темно-синие.
- б) Хромосомы — темно-синие.
- в) Ядрышки — красноватые.
- г) Хрящевая ткань — светло-голубая, темно-синяя.
- д) Базальная мембрана — розовая.
- е) Цитоплазма — различные оттенки розового.
- ж) Мышечные волокна, коллоид щитовидной железы, эластичные волокна — темно-розовые.
- з) Коллаген и костная ткань — светло-розовые.

9.3.2. Окрашивание по методу иодная кислота — реактив Шиффа (реакция ШИК)

Этот метод используется для выявления полисахаридов (гликоген), нейтральных мукополисахаридов, мукопротеинов, гликопротеинов и гликолипидов.

Рис. 7.10. Предстательная железа взрослых мышей. Влияние 20-метилхолантрена и обратимость его действия. 1 — Предстательная железа мыши, растущая в течение 3 нед в контрольной среде. Видны альвеолы, окаймленные одним слоем слизистого секреторного эпителия. Окраска ШИК после гидролиза диастазой. Увеличение 243X. 2 — Гиперпластические альвеолы в предстательной железе мыши, обработанной в течение 11 дней канцерогеном, а затем инкубированной 10 сут в контрольной среде. Видны мелкие плотно расположенные клетки; много делящихся клеток. Гематоксилин. Увеличение 304X. 3 — Альвеолы в предстательной железе мышей, обработанной в течение 11 сут 20-метилхолантроном и затем инкубированной 10 сут с аналогом витамина А. Обратите внимание на отсутствие гиперплазии. Эпителиальная выстилка состоит из одного ряда цилиндрических клеток. Гематоксилин-эозин. Увеличение 410X.



1. Схема окрашивания.

- а) После депарафинирования проведите срезы через серию спиртов со снижающейся концентрацией, вплоть до дистиллированной воды.
- б) Окислите 1%-ной йодной кислотой в течение 15 мин.
- в) Промойте 15 мин в проточной водопроводной воде и ополосните дистиллированной водой.
- г) Проинкубируйте срезы в темноте в реактиве Шиффа в течение 10—20 мин.
- д) Промойте 10 мин в проточной водопроводной воде.
- е) Окрасьте ядра гематоксилином Майера в течение 10 мин. Гематоксилин Эрлиха в данном случае непригоден, так как окрашивает также некоторые ШИК-положительные компоненты ткани.

- ж) Обезводьте в серии возрастающих концентраций спирта по 2 мин в каждом разведении.
- з) Осветлите последовательно в двух сменах ксилола по 2 мин в каждой.
- и) Заключите в синтетическую смолу DPX.

II. Результаты.

- а) ШИК-положительные вещества окрашиваются красным или фуксиново-красным; ядра окрашиваются голубым.

При проведении некоторых экспериментов оказывается необходимым исключить гликоген. Последний может быть удален путем инкубации срезов с диастазой перед окрашиванием, после чего протокол окрашивания несколько изменяется.

- а) Перенесите срезы в дистиллированную воду.
- б) Инкубируйте срезы с 1%-ной диастазой в течение 12 мин.
- в) Ополосните дистиллированной водой.
- г) Промойте срезы в проточной водопроводной воде 5 мин.
- д) Перенесите на 15 мин в 1%-ный раствор иодной кислоты.

Остальные этапы — в соответствии с приведенным выше протоколом.

9.3.3. Азановое замещение

Этот метод окраски позволяет надежно дифференцировать эпителий, строму и хрящевую ткань; при этом выявляются базальные мембраны между эпителием и подлежащей стромой.

I. Схема окрашивания

- а) Депарафинированные срезы проведите через серию спиртов с понижающейся концентрацией, вплоть до дистиллированной воды.
- б) Поместите на 20 мин в квасцовый кармин.
- в) Промойте дистиллированной водой в течение 1 мин.
- г) Перенесите на 5 мин в 1%-ную фосфомолибденовую кислоту.
- д) Промойте дистиллированной водой в течение 1 мин.
- е) Перенесите на 10 мин в анилиновый голубой.
- ж) Промойте 1 мин в дистиллированной воде.
- з) Дифференцируйте в 96%-ном этаноле в течение 5 мин.
- и) Проведите через абсолютный этанол (10 погружений), второй абсолютный этанол (2 мин), ксилол (5 мин) и второй ксилол (5 мин).
- к) Заключите в синтетическую смолу DPX.

II. Результаты.

- а) Ядра — красные.
- б) Хромосомы — красные.

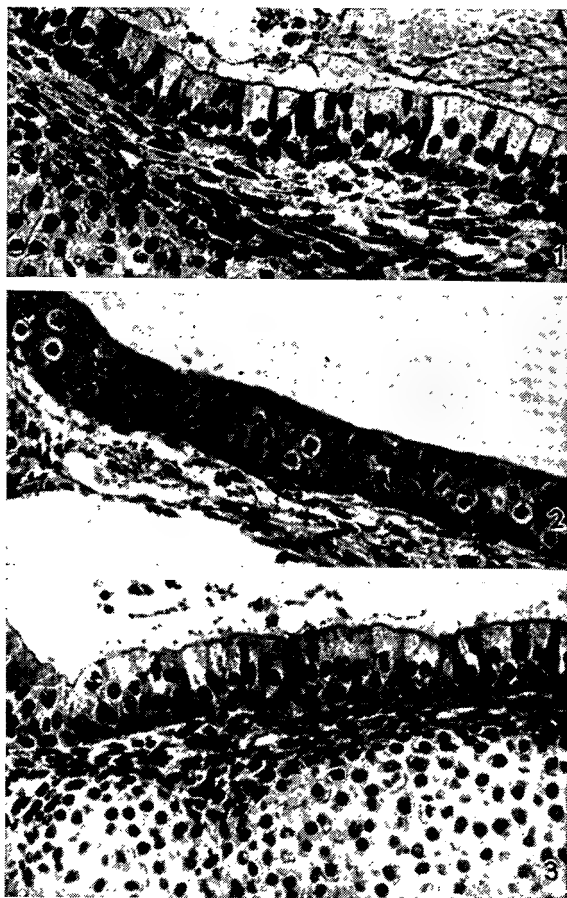


Рис. 7.11. Трахеи новорожденных крыс. Влияние конденсата сигаретного дыма и обратимость его действия. 1—Трахея, растущая 18 дней в контрольной среде. Эпителиальная выстилка состоит из цилиндрических реснитчатых клеток. Азановое замещение. Увеличение 379X. 2—Трахея, растущая 14 дней в присутствии конденсата сигаретного дыма с последующей инкубацией в контрольной среде в течение 4 сут. Клетки теряют жгутики, и эпителий состоит из большого числа плотно расположенных мелких клеток с высокой частотой делений. Азановое замещение. Увеличение 379X. 3—Трахея, растущая 14 дней в присутствии конденсата сигаретного дыма, а затем 4 дня в присутствии аналога витамина А. Эффекты конденсата отсутствуют. Азановое замещение. Увеличение 379X.

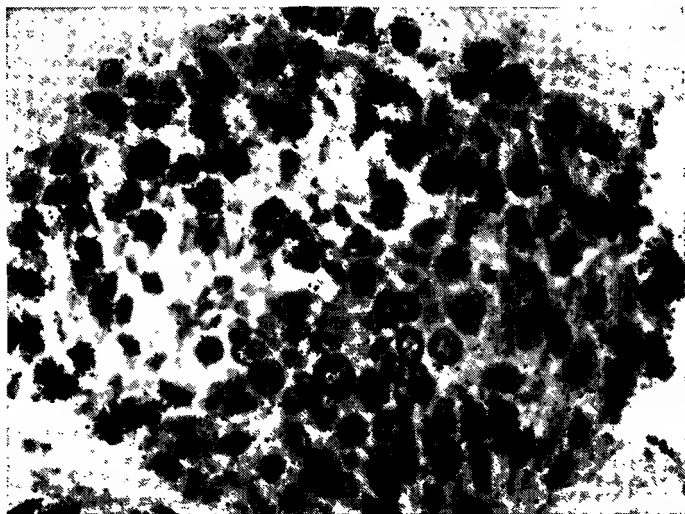


Рис. 7.12. Радиоавтограф, демонстрирующий включение ^3H -уридина в клетки эпителия при доброкачественной гиперплазии предстательной железы человека. Ткань культивировали 7 дней в присутствии тестостерона. Увеличение $572\times$.

- в) Цитоплазма эпителия — розовая.
- г) Базальная мембрана — ярко-синяя.
- д) Коллаген — синий.
- е) Хрящевая ткань — синяя.

10. Радиоавтография

Уровень включения изотопа в ткань, определяемый путем экстракции и подсчета радиоактивности, свидетельствует об общем включении. Судить о характере распределения изотопа между клетками и различными компонентами ткани по этим данным мы не можем. Такая информация может быть получена с помощью радиоавтографии, которая точно указывает на включение в различные компоненты ткани и составляющие их клетки, а также мечение их ядер и цитоплазмы. Распределение метки может быть изучено путем световой микроскопии специально обработанных срезов.

Первоначально радиоавтографы готовились в соответствии с методом Доннэ и Пелк [58] с использованием накладываемых пленок Кодак AR 10, но впоследствии всеобщее применение нашел метод погружения в эмульсию. Последний метод занимает меньше времени и обеспечивает лучшее разрешение

благодаря значительно меньшей толщине пленки. Ниже будет приведено описание метода погружения в эмульсию, а метод накладывающихся пленок будет рассмотрен в гл. 9.

10.1. Обработка мечеными препаратами

Удалите эксплантаты с полосок бумаги для чистки оптики или миллипоровых фильтров и погрузите в 2 мл свежей среды при 37 °С.

- I. *Синтез ДНК.* Добавьте ^3H -тимидин до концентрации 1 мКи/мл (37 кБк/мл). Хорошо перемешайте и инкубируйте культуру в течение 5 ч.
- II. *Синтез РНК.* Добавьте ^3H -уридин до концентрации 10 мКи/мл (370 кБк/мл). Хорошо перемешайте и инкубируйте 40 мин. При таком коротком времени инкубирования радиоактивной оказывается в основном быстрометящаяся РНК ядер. При более длительном периоде инкубации возрастает радиоактивность цитоплазмы за счет рРНК и вышедших из ядра мРНК.
- III. *Синтез белка.* Добавьте ^3H -лейцин до концентрации 10 мКи/мл (370 кБк/мл). Хорошо перемешайте и инкубируйте 40 мин.

10.2. Фиксация

В конце инкубации достаньте эксплантаты из среды и промойте их тщательно раствором Хэнкса для удаления невключившегося радиоактивного материала. Для фиксации поместите в смесь спирта и уксусной кислоты (1 часть ледяной уксусной кислоты и 3 части 80%-ного этанола) на 25 мин. Затем проинкубируйте по 1 ч в двух сменах 10%-ного формалина.

10.3. Обезвоживание и заключение

Применяется та же процедура, что описана в разд. 9.2, но срезы готовятся толщиной 4 мкм.

10.4. Процедура заливки

10.4.1. Материалы и аппаратура

Эмульсия Илфорд К5 для ядерных исследований [5] в форме геля. Хранится в холодильнике при 4 °С. Сохраняется в течение 6 нед после начала использования. Неоткрытую упаковку можно хранить 3 мес и более.

2 небольших лабораторных стакана.

Стеклянная или пропиленовая кассета и ложка.

Пинцеты.
Пробные предметные стекла.
Штатив для высушивания.
Темный пластиковый ящик.
Силикагель.
Перегнанная в стекле вода.

10.4.2. Приготовление эмульсии

- I. Вскройте контейнер с эмульсией в темной комнате с безопасным красным светом с фильтром Кодак.
- II. Стеклой или пластиковой ложкой перенесите эмульсию в химически чистый лабораторный стакан в количестве, достаточном для одноразового использования.
- III. Расплавьте эмульсию на водяной бане при 40—42 °С.
- IV. После расплавления заполните эмульсией стеклянный контейнер на две трети и долейте доверху водой, перегнанной в стекле, предварительно нагретой до 40—42 °С.
- V. Закройте контейнер и один-два раза переверните.
- VI. Установите контейнер в водяную баню и дайте постоять 1—2 мин до погружения препаратов.

10.4.3. Нанесение эмульсии

- I. Перед погружением предметных стекол со срезами осветлите их в ксилоле и проведите через смесь ксилола с этанолом (50 : 50) и серию спиртов со снижающейся концентрацией (100, 90, 70, 50 и 30%) по 2 мин в каждом. Перенесите стекла в дистиллированную воду.
- II. Кислоторастворимые предшественники ДНК, РНК и белка могут быть удалены ледяной 100%-ной трихлоруксусной кислотой (2 раза по 10 мин), после чего препараты следует трижды промыть ледяной дистиллированной водой.
- III. Стекла в дистиллированной воде перенесите в водяную баню и промойте 1—2 раза водой, перегнанной в стекле. Выньте стекла и дайте стечь воде, но не допускайте высыхания препаратов.
- IV. Вначале опустите в эмульсию пробные предметные стекла, чтобы убедиться в полном расплавлении эмульсии и ее однородности. При рассмотрении на безопасном свете стекла должны быть покрыты тонкой равномерной серовой пленкой.
- V. Опустите в эмульсию опытные стекла. Выньте из эмульсии, прислоните стекло к краю кассеты так, чтобы стек избыток эмульсии. Затем переверните стекло и установите его в выемку штатива для высушивания (стекла должны сушиться в вертикальном положении).

- VI. Предметные стекла высушиваются в течение 1 ч при комнатной температуре или в течение 5—10 мин при использовании фена.
- VII. После высушивания поместите стекла в светонепроницаемый темный ящик, содержащий пробирки с силикагелем, и установите в холодильник при 4 °С.
- VIII. Рекомендуется экспонировать пробные предметные стекла в течение различного времени для выбора оптимального периода экспозиции. Оказались эффективными следующие времена экспозиции, которые можно выбирать в качестве отправной точки: ^3H -тимидин — 6—7 дней, ^3H -уридин — 8—10 дней, ^3H -лейцин — 8—10 дней.

10.4.4. Проявление

- I. Используйте проявитель Кодак К 19.
- II. Отфильтруйте раствор перед использованием.
- III. Проявляйте 4—5 мин при 18—21 °С.
- IV. Ополосните дистиллированной водой.
- V. Фиксируйте в амфиксе (1:10) в течение 2—3 мин или до осветления пленки.
- VI. Промойте и перенесите в осветляющий раствор (Кодак) на 2 мин.
- VII. Промойте 5 мин проточной водопроводной водой и затем тремя сменами деионизированной или перегнанной в стекле воды.

10.4.5. Окрашивание

Стекла можно высушить, а можно перенести непосредственно из дистиллированной воды в краситель. Результаты в таком случае получаются лучше. Для окраски обычно используются гематоксилин-эозин или квасцовый кармин.

10.4.6. Интерпретация результатов

При микроскопическом обследовании метка проявляется обычно в виде темных зерен над ядром (^3H -тимидин, ^3H -уридин) или над цитоплазмой (^3H -лейцин). Если инкубацию с ^3H -уридином продолжить более 40 мин, то происходит частичное перемещение метки в цитоплазму.

Пленка эмульсии очень тонка и однородна, так что гистологическая структура ткани и изменения характера ее роста могут быть легко выявлены и сопоставлены с локализацией и степенью включения меченых предшественников.

Включение изотопов может быть оценено количественно, путем подсчета числа меченых и немеченых клеток, и результаты

могут быть представлены в форме относительного количества меченых клеток и его среднеквадратичного отклонения (индекс метки). Интенсивность включения можно оценивать подсчетом числа зерен над индивидуальной клеткой; результаты тогда представляются в форме среднего числа зерен на клетку и его среднеквадратичного отклонения (количество зерен). Для оценки индекса метки используются более высокие концентрации изотопа для увеличения плотности зерен так, чтобы ядро стало совсем черным. Это облегчает подсчет меченых ядер. Для оценки количества зерен используется меньшая плотность зерен (20—30 зерен на клетку).

11. Количественная оценка результатов

Изменения морфологии, индуцированные химическими или физическими воздействиями, могут быть количественно оценены и отнесены к изменениям пролиферации или синтеза ДНК, РНК и белка. Среднее число эксплантатов на каждую точку должно быть не ниже 6.

Чтобы исключить влияние на результат возможных различий в разных участках эксплантата, рекомендуется использовать серийные срезы и просчитывать изменения либо на всех срезах, либо на каждом втором.

Так, например, чтобы оценить частоту гиперплазий, индуцируемых канцерогеном или митогеном, следует подсчитать количество гиперпластических и нормальных структур и представить результаты в форме относительного содержания гиперпластических структур и его среднеквадратичного отклонения.

Для определения частоты митозов проводится подсчет делящихся и интерфазных клеток на серийных срезах эксплантатов, инкубированных с колцемидом (2 мкг/мл) или другим агентом, вызывающим остановку деления клеток в метафазе, в течение 5 ч до фиксации. Результаты представляются как число митотических клеток, отнесенное к общему числу клеток, и его среднеквадратичное отклонение.

Синтез ДНК, РНК и белка оценивается путем подсчета меченых и немеченых клеток на радиоавтографах серийных срезов эксплантатов, проинкубированных с соответствующими предшественниками. Результаты также представляются в форме относительного числа меченых клеток и его среднеквадратичного отклонения.

Этот метод обеспечивает получение достоверных результатов, воспроизводимых в повторных экспериментах. Для подтверждения результатов бывает достаточно одного или двух повторов.

12. Преимущества и недостатки органной культуры

В органной культуре различные компоненты ткани, их пространственная взаимосвязь и функциональная активность при определенных условиях сохраняются *in vitro*. Особую важность имеет сохранение стромы, поскольку она представляется незаменимой для поддержания роста и дифференцировки эпителия. Благодаря этому ткань в органной культуре оказывается более физиологичной экспериментальной моделью по сравнению с культурой клеток. И вопреки имеющемуся мнению, приготовление органной культуры не более сложная процедура, чем ведение культуры клеток.

Эмбриональные органы или их зачатки развиваются *in vitro* примерно таким же образом, как и *in vivo*. Эпителий в присутствии стромы растет и дифференцируется в свойственной ему манере и продуцирует специфические секреторные белки. Органы, зависящие от гормонов, такие как предстательная и молочная железы, влагалище и матка, сохраняют чувствительность к гормонам и способность к ответам на гормоны *in vitro*. Эндокринные органы (яичники, семенники, надпочечники и гипофиз) продолжают секретировать *in vitro* специфические гормоны.

Таким образом, ведение ткани в органной культуре может обеспечивать получение важной информации о нормальном развитии, росте и дифференцировке и о влиянии внешних факторов на эти параметры. Результаты *in vitro* получаются, как правило, быстрее, чем *in vivo*, и при необходимости им легко дать количественное выражение. При этом обеспечивается достоверность и воспроизводимость получаемых результатов.

Закономерен вопрос, может ли органная культура полностью заменить эксперименты на животных *in vivo*? Интерпретация результатов, полученных *in vivo*, может быть затруднена действием системных факторов, так что элиминация этих факторов в опытах *in vitro* позволяет подходить к решению проблемы в чистом виде. Однако не все результаты, полученные *in vitro*, можно экстраполировать на ситуацию *in vivo*. Те же самые системные факторы могут обладать контролирующим действием и модифицировать наблюдаемые *in vitro* процессы. Так, изучение действия лекарств *in vitro* и *in vivo* нередко приводит к противоречивым результатам, поскольку некоторые лекарства метаболизируются *in vivo*, но не *in vitro*.

Другая проблема органной культуры связана с фактором времени. Период культивирования в органной культуре не бывает бесконечным и к настоящему времени не превышает нескольких месяцев. Это время может оказаться слишком коротким, если необходимо длительное воздействие внешних факторов. В таких случаях удобно применять комбинированную систему *in vitro*/*in vivo*, в которой обработанная *in vitro* ткань

имплантируется подходящему животному-хозяину. Этот метод облегчается благодаря использованию бестимусных мышей.

Эксперименты в органных культурах не всегда могут заменить опыты на животных. Однако результаты, полученные *in vitro*, могут служить ключом к пониманию событий *in vivo* и тем самым значительно сократить число экспериментов на животных, необходимое для решения той или иной проблемы.

Литература

1. Loeb B. (1897). Über die Entstehung von Bindegewebe, Leucocyten und roten Blutkörperchen aus Epithel und eine Methode, isolierte Gewebsteile zu züchten, published by M. Stern & Co., Chicago.
2. Harrison R. G. (1907). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 4, 140.
3. Loeb L., Fleischer M. S. (1919). J. Med. Res., 40, 509.
4. Parker R. C. (1936). Science (Wash.), 83, 379.
5. Medawar P. B. (1948). Q. J. Microsc. Sci., 89, 187.
6. Fell H. B., Robison R. (1929). Biochem. J., 23, 767.
7. Lasnitzki I. (1963). Natl. Cancer Inst. Monogr., 12, 281.
8. Rudnick D. (1938). J. Exp. Zool., 78, 369.
9. Gaillard P. J. (1951). In: Methods in Medical Research, Vol. 4, Visscher M. B. (ed.), Year Book Publishers, Chicago.
10. Spratt N. T., Jr. (1947). Science (Wash.), 106, 542.
11. Spratt N. T., Jr. (1948). J. Exp. Zool., 107, 39.
12. Wolff E. T., Haffen K. (1952). Tex. Rep. Biol. Med., 10, 463.
13. Chen J. M. (1954). Exp. Cell Res., 5, 10.
14. Richter K. M. (1958). J. Oklahoma State Med. Assoc., 252.
15. Lash J., Holtzer S., Holtzer H. (1957). Exp. Cell Res., 13, 292.
16. Shaffer B. B. (1956). Exp. Cell Res., 11, 244.
17. Trowell O. A. (1954). Exp. Cell Res., 6, 246.
18. Trowell O. A. (1959). Exp. Cell Res., 16, 118.
19. Trowell O. A. (1961). Coll. Intern. CNRS, 101, p. 237.
20. Barret L. A., McDowell E. M., Frank A. L., Harris C. C., Trump B. F. (1976). Cancer Res., 36, 1003.
21. Hillman E. A., Valerio M. G., Halter S. A., Barret-Boone L. A., Trump B. F. (1983). Cancer Res., 43, 245.
22. Hillman E. A., Vocci M. J., Schurch W., Harris C. C., Trump B. F. (1980). In: Methods in Cell Biology, Vol. 21, Harris C. C., Trump B. G., Stoner G. D. (eds.), Academic Press, New York, p. 331.
23. Schurch W., McDowell E. M., Trump B. F. (1978). Cancer Res., 38, 3723.
24. Paul J. (1975). Cell and Tissue Culture, Fifth Edition, published by E & S Livingstone, London.
25. Lasnitzki I. (1951). Br. J. Cancer, 5, 345.
26. Fell H. B., Canti R. G. (1934). Proc. R. Soc. Lond., Ser. B, 119, 470.
27. Fell H. B. (1939). Trans. R. Soc. Lond., Ser. B, 229, 407.
28. Fell H. B., Mellanby E. (1953). J. Physiol., 119, 470.
29. Lasnitzki I. (1963). J. Exp. Med., 118, 1.
30. Lasnitzki I. (1955a). J. Endocrinol., 12, 236.
31. Lasnitzki I. (1955b). Br. J. Cancer, 9, 435.
32. Lasnitzki I. (1958). Br. J. Cancer, 12, 547.
33. Lasnitzki I. (1956). Br. J. Cancer, 10, 510.
34. Murray M. R., Stout A. O. (1947). Am. J. Anat., 80, 225.
35. Hardy M. H. (1978). Am. Tissue Culture Assoc. Publ.
36. Hardy M. H. (1967). Exp. Cell Res., 46, 377.
37. Biggers J. D., Claringbold P. J., Hardy M. H. (1956). J. Physiol., 131, 497.

38. Moon Y. S., Hardy M. H. (1973). *Am. J. Anat.*, **138**, 253.
39. Wolff Et., Haffen K., Kieny M., Wolff Em. (1953). *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **1**, 55.
40. Wolff Et. (1960). *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris*, **250**, 3881.
41. Wolff Et., Smith J., Wolff Em. (1975). In: *Organ in Biomedical Research*, Balls M., Monnickendam M. A. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 405.
42. Lasnitzki I., Mizuno T. (1977). *J. Endocrinol.*, **74**, 47.
43. Lasnitzki I., Misuno T. (1979). *J. Endocrinol.*, **82**, 171.
44. New D. A. T., Coppola P. T., Cockcroft D. L. (1976). *J. Reprod. Fertil.*, **48**, 219.
45. New D. A. T. (1983). In: *Methods for Assessing the Effect of Chemicals on Reproductive Functions*, Vouk V. B., Sheehan F. J. (eds.), p. 277.
46. Cockcroft D. L. (1980). *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.*, **28**, 117.
47. Fainstat T. (1968). *Fertil. Steril.*, **19**, 317.
48. Lasnitzki I. (1976). In: *Organ Culture in Biomedical Research*, Ball M., Monnickendam M. E. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 241.
49. McMahon M. J., Thomas G. H. (1973). *Br. J. Cancer*, **27**, 323.
50. Lasnitzki I., Whitaker R. H., Withycombe J. F. R. (1975). *Br. J. Cancer*, **32**, 168.
51. Hodges G. M., Hicks R. M., Spacey G. D. (1977). *Cancer Res.*, **37**, 3720.
52. Knowles M. A., Finesilver A., Harvey A. E., Berry R. Z., Hicks R. M. (1983). *Cancer Res.*, **43**, 374.
53. Lasnitzki I. (1968). *Cancer Res.*, **28**, 510.
54. Lasnitzki I., Goodman D. S. (1974). *Cancer Res.*, **34**, 1564.
55. Lasnitzki I. (1976). *Br. J. Cancer*, **34**, 239.
56. Lasnitzki I., Bollag W. (1982). *Cancer Treat. Rep.*, **66**, 1375.
57. Lasnitzki I. Unpublished observations.
58. Doniach I., Pelc S. R. (1950). *Br. J. Radiol.*, **23**, 184.

ТЕСТЫ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

Э. Вилсон

1. Введение

Программы поисков новых химиотерапевтических средств включают в себя широкие предклинические испытания огромного количества химических соединений для выявления их противоопухолевой активности. Оценка безопасности таких веществ, как лекарства, косметические средства, пищевые добавки, пестициды и промышленные химические соединения, делает необходимой проверку еще большего круга веществ. Важную роль в таких исследованиях всегда играли лабораторные животные. Культуры клеток применялись главным образом при поисках противоопухолевых препаратов, ценность этих систем для оценки цитотоксичности и жизнеспособности в настоящее время не вызывает сомнения. Сейчас все более выявляется необходимость использования систем *in vitro* в обеих программах проверки химических соединений. Прежде всего такая необходимость обусловлена экономическими соображениями, поскольку системы проверки *in vitro* оказываются дешевле систем *in vivo*. Вторым соображением в пользу систем *in vitro* является ограниченность применения результатов, полученных на животных, к человеку вследствие значительного количества видовых различий в метаболизме. И наконец, системы *in vitro* привлекательны с моральной точки зрения, поскольку они уменьшают количество экспериментов на животных.

Оценка безопасности химических соединений включает в себя широкий круг исследований их мутагенности, канцерогенности, тератогенности и токсичности. Полное описание исследований в этих направлениях выходит за рамки этой главы. Мы остановимся лишь на проблеме острой токсичности, которая одинаково существенна при оценке применимости данного препарата в химиотерапии рака и при оценке безопасности химического соединения. Это вытекает из результатов многочисленных исследований в области химиотерапии рака за последние 40 лет. Модельные системы, использовавшиеся наиболее широко, вызывают большой интерес с точки зрения противоопухолевой активности и токсичности вообще.

Основные требования к обоим путям применения этих систем оказываются сходными. Во-первых, системы тестирования должны давать воспроизводимые и устойчивые зависимости

результата от концентрации в диапазоне концентраций лекарств, превышающих дозы, действующие *in vivo*. Во-вторых, выбранные критерии ответа должны линейно зависеть от числа клеток. И наконец, информация, получаемая на основе кривой доза — ответ, должна иметь прогностическое значение для действия того же самого лекарства *in vivo*.

2. Общие сведения

Использование систем *in vitro* стало основным методом скрининга возможных противоопухолевых соединений с самого начала клинической химиотерапии рака в 1946 г.; тогда было впервые обнаружено противоопухолевое действие азотистого иприта. В многочисленных обзорах приведена история развития этих методов и областей их применения [1, 2], а также современное состояние проблемы [3—5]. Ситуация с оценкой безопасности лекарств также рассмотрена в трудах симпозиума, проведенного недавно Обществом исследований человека [6].

Ранние исследования цитотоксичности носили главным образом качественный характер. Для изучения действия лекарства использовались эксплантаты ткани, растущие на химически неопределенной среде, и для придания результатам «количественного» оттенка использовались либо оценки морфологического повреждения, либо степень подавления процесса роста клеток из эксплантатов. Введение в практику полуопределенных культуральных сред, а также разработка методов выращивания отдельных клеток на стекле в форме монослоя позволили стандартизировать исследования и ввести достаточно обоснованную оценку клеточного ответа. Используя эту технику в сочетании с измерением количества белка в обработанных и необработанных клетках, Игл и Фоли смогли продемонстрировать четкую корреляцию между действием противоопухолевых препаратов *in vitro* и *in vivo* [7], что подтвердило пригодность метода. Система тестирования *in vitro* была впоследствии включена в программу скрининга Национального центра по химиотерапии рака (CCNSC; Cancer Chemotherapy National Service Centre). Этот метод оказался основным при предварительном скрининге в ходе очистки продуктов ферментации вследствие его простоты, необходимости малых количеств исследуемых соединений и низкой стоимости — все это не может быть обеспечено системами скрининга *in vivo* [3].

Накапливающиеся результаты клинических и экспериментальных исследований показывают, что опухоли даже идентичной гистологии часто в разной степени чувствительны к действию химиотерапевтических препаратов. Успешное развитие метода агаровых пластинок для скрининга антибиотиков *in vitro*

вызвало интерес к развитию аналогичной техники для «направленной» химиотерапии, пригодной для данной опухоли и данного пациента. Такой подход позволяет избежать неэффективной терапии, вред которой усугубляется высокой токсичностью препаратов. Впервые эта идея нашла экспериментальное воплощение в работах Райта с сотрудниками [8], использовавшими эксплантаты опухолевой ткани, и вслед за этим появились многочисленные публикации, целью которых было исследование корреляции эффектов *in vitro* и *in vivo* на ткани человека. Используемая в этих исследованиях методология значительно варьировала, что отражало множественность факторов, которые следует учитывать при разработке таких тестов. Однако, невзирая на такую гетерогенность, результаты большинства исследований показывают на наличие 90%-ной положительной корреляции между резистентностью *in vitro* и клинической резистентностью и 60%-ной положительной корреляции между чувствительностью *in vitro* и клиническими ответами. Полученные результаты показывают также, что относительное количество культур клеток, чувствительных к действию химиопрепаратов, соответствуют частоте опухолей, реагирующих на данный препарат [9, 10].

Взаимосвязь между чувствительностью к лекарству *in vitro* первичных культур опухолевых клеток человека и соответствующих опухолей *in vivo* указывает на перспективность использования таких культур в программах скрининга лекарственных средств. Ясно, что первичные культуры опухолевых клеток являются более близким приближением к клинической ситуации у человека, чем ограниченный набор используемых обычно клеточных линий. Именно в этом контексте исследуется сейчас роль программы «Испытания стволовых клеток опухолей человека» [11].

Системы культур *in vitro* широко используются также для изучения механизма действия лекарств; в этих работах применяются те же технические подходы, хотя может требоваться более специфический биохимический тест.

3. Специфические методы

Решение о выборе того или иного метода принимается на основе условий, в которых проводится тестирование природы клеток-мишеней и самого исследуемого соединения. Параметры, по которым различаются разные системы тестирования, включают в себя:

- I. метод культивирования;
- II. продолжительность воздействия лекарства;

- III. продолжительность восстановительного периода после воздействия лекарства;
- IV. конечный результат, используемый для количественной оценки действия лекарства.

3.1. Методы культивирования

Выбор метода культивирования зависит от природы клеток-мишеней и продолжительности воздействия. В некоторой степени тот или иной метод определяет конечный результат эксперимента.

3.1.1. Органная культура

Преимущества органной культуры заключаются в поддержании целостности ткани и межклеточных взаимодействий; таким образом, органная культура наиболее приближается к ситуации *in vivo* по сравнению с другими известными методами культивирования. Количественная оценка действия лекарств на клетки в органной культуре затруднительна хотя бы из-за значительной клеточной гетерогенности эксплантатов. Так что, хотя этот метод и нашел широкое применение в исследованиях чувствительности к гормонам соответствующих тканей, использование органных культур в исследованиях чувствительности к лекарствам обстаетя ограниченным. Эта проблема обсуждена в недавно опубликованной обзорной статье [12], а также в гл. 7 этого сборника.

3.1.2. Сфероиды

Сфероиды возникают благодаря спонтанной агрегации клеток в сферические массы, растущие благодаря пролиферации составляющих их клеток. Структура сфероидов аналогична структуре мелких опухолевых узелков, так что использование сфероидов позволяет определять чувствительность к лекарствам клеток, организованных в трехмерные структуры, избегая указанных выше недостатков органных культур. В культурах сфероидов можно изучать следующие специфические проблемы:

- I. барьеры проницаемости для лекарств в тканях, не содержащих сосудов;
- II. эффекты метаболических градиентов (например, pO_2 , pCO_2);
- III. эффекты градиентов пролиферации.

Большинство исследований проведено на сфероидах, полученных из культивируемых линий клеток. Клетки первичных культур опухолей человека примерно в 50% случаев также склонны к образованию сфероидов. Способность нормальных

клеток к формированию сфероидов ниже, чем у опухолевых, и это имеет большое значение, поскольку позволяет избавиться от элементов стромы в ходе агрегации биопсийного материала опухолей человека. Для определения чувствительности к лекарствам в этой системе требуется обычно не менее 2 нед, так что метод оказывается непригодным в ситуациях, требующих быстрого ответа.

3.1.3. Суспензионные культуры

I. Кратковременные культуры (4—24 ч). Кратковременное поддержание клеток в суспензии для анализа чувствительности к препаратам возможно для клеток из любого источника. Если клетки получены из биопсийного материала опухоли человека, то тест-система имеет ряд теоретических преимуществ: способность к росту не является лимитирующим фактором, поскольку рост в этой системе не требуется; разрастание клеток стромы и клональный отбор сведены к минимуму, так что результаты могут быть получены быстро, что особенно важно, если испытание проводится с клиническими целями. Метод получил широкое использование в ФРГ при изучении чувствительности к ряду химиотерапевтических препаратов различных типов опухолей [13, 14]. Модифицированный метод с использованием либо клеток, либо фрагментов тканей был применен Силвестрини с сотрудниками [10] также для различных типов опухолей. В обоих вариантах исследовали включение нуклеотидов, меченных тритием, в ДНК или РНК. Ограничения этого метода заключаются главным образом в короткой продолжительности опыта; это исключает возможность длительного воздействия лекарственных средств в течение одного или нескольких клеточных циклов. Следовательно, этим методом нельзя исследовать обратимость действия лекарства и остаточную цитотоксичность, что существенно ограничивает круг исследуемых препаратов. Было показано, что при использовании этой тест-системы получаются ложно-отрицательные результаты действия адриамицина [14], хотя имелись сообщения об успешном применении системы при анализе действия других лекарств с иными механизмами действия [10].

II. Промежуточная длительность (4—7 дней). Суспензионные культуры с промежуточной продолжительностью жизни особенно пригодны при изучении чувствительности к химиотерапевтическим агентам злокачественных кроветворных клеток. Более подробное описание можно найти в нескольких недавно опубликованных исследованиях [15—17].

3.1.4. Монослойные культуры

Метод выращивания клеток в монослое наиболее часто используется при анализе цитотоксичности в клеточных линиях, но иногда он используется при анализе чувствительности биопсий целого ряда опухолей разных типов. Главная проблема, возникающая при работе с биопсийным материалом, заключается в том, что не всегда удастся достигнуть адгезии и пролиферации опухолевых клеток, а кроме того, слишком часто наблюдается зарастание опухолевых культур клетками стромы (фибробласты и мезотелий). Важность этих проблем различна для разных типов опухолей (высока для карцином молочной железы, умеренна для опухолей яичников и малосущественна для глиом).

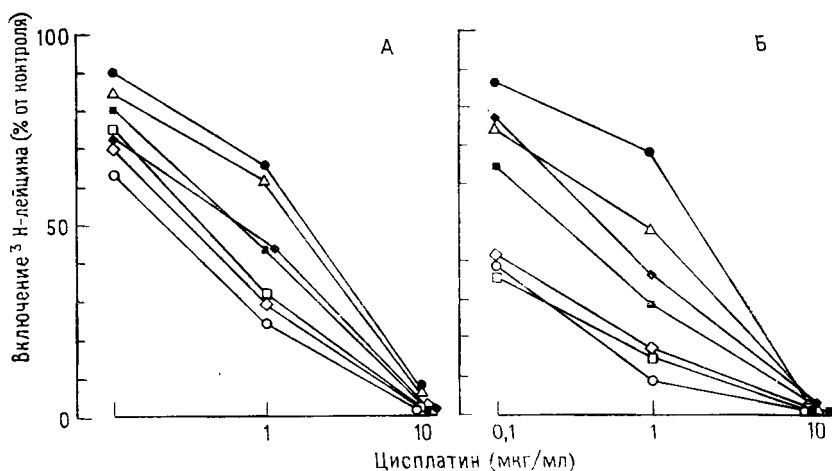


Рис. 8.1. Влияние различного соотношения клеток мезотелия (А) и фибробластов (Б) на чувствительность клеток опухоли яичников (линия ОАВ42) к цисплатину (Э. П. Вилсон, неопубликованные результаты). □ — 10% клеток стромы; ◇ — 30% клеток стромы; ■ — 50% клеток стромы; ◆ — 70% клеток стромы; ● — 90% клеток стромы; ○ — 100% клеток ОАВ42; △ — 100% клеток стромы. Определение чувствительности проводилось с помощью опыта на микротитровальных пластинках, как описано в разд. 9.4.2.

Существенным этапом в применении этого метода является тот или иной способ идентификации клеток. Клетки стромы являются наиболее резистентными к химиотерапевтическим агентам, но загрязнение линии клеток опухоли яичника (ОАВ42) клетками стромы на 30% оказывает очень слабое действие на чувствительность культуры. Следовательно, ответ культуры на химиопрепараты обеспечивается главным образом

опухолевыми клетками. Более высокий уровень загрязнения опухолевых клеток клетками стромы приводит к снижению чувствительности культур. В этой серии экспериментов не было показано, чтобы клетки стромы придавали резистентность опухолевым клеткам (рис. 8.1; Вилсон, неопубликованные данные). Аналогичные результаты были получены для веществ, относящихся к антибиотикам, антимиотическим агентам, алкилирующим агентам и антиметаболитам.

Метод культуры ткани наиболее перспективен в изучении необходимой продолжительности воздействия лекарства и восстановления клеток и в разработке методов количественной оценки действия лекарств. Монослойная культура требует наименьшего количества клеток и незаменима, следовательно, при создании микрометодов, обеспечивающих множественный скрининг лекарств в широком диапазоне концентраций. Кроме того, использование этого метода облегчает автоматизацию испытаний. Если количество клеток на самом деле слишком мало, то часто бывает возможным культивировать клетки до тех пор, пока не получится достаточное для анализа количество, несмотря на то, что данные об изменении чувствительности клеток к препаратам в ходе культивирования оказываются противоречивыми. Как правило, два — три пассажа клеток не влияют на чувствительность, и такое пассирование даже рекомендуется, поскольку приводит к снижению вариабельности результатов между параллельными культурами [18]. Если примесь клеток стромы очень высока, то пассирование клеток часто представляет возможность «очистить» опухолевые клетки путем дифференциальной ферментативной обработки или физического отбора клеток (см. гл. 5 и 6).

3.1.5. Клонирование в мягком агаре

Клетки, получаемые непосредственно из опухолей, можно клонировать на стекле в виде монослойной культуры. Однако в последнее время появляется все больше данных о клонировании клеток в суспензии, при котором удается избавиться от стромальных элементов, которым необходима для роста твердая подложка. Теоретически преимущество клонирования в суспензии состоит в том, что в такой системе эффектам подвержены лишь клетки с высокой способностью к самообновлению (возможно, стволовые клетки опухолей); клетки с низкой пролиферативной активностью, составляющие большую часть опухоли, в формировании ответа не участвуют. Это, однако, справедливо только в том случае, когда колонии представляют собой истинные клоны (то есть возникают из единичной клетки, а не из клеточного агрегата) и подсчет их производится после многих клеточных генераций. В реальных исследованиях эти требова-

ния часто не выполняются. Эффективность клонирования часто составляет 0,01—0,1%, и при этих величинах трудно исключить возможность агрегации. При клонировании на стекле колонии легко получить после 10 генераций (около 1000 клеток), тогда как при клонировании в суспензии подсчет колоний часто проводится после 4—6 генераций (16—64 клетки). Принимая во внимание, что некоторые из этих колоний образуются из агрегатов в 3—4 клетки, число делений клеток в таких колониях часто не превышает двух. В этих условиях трудно что-либо го-

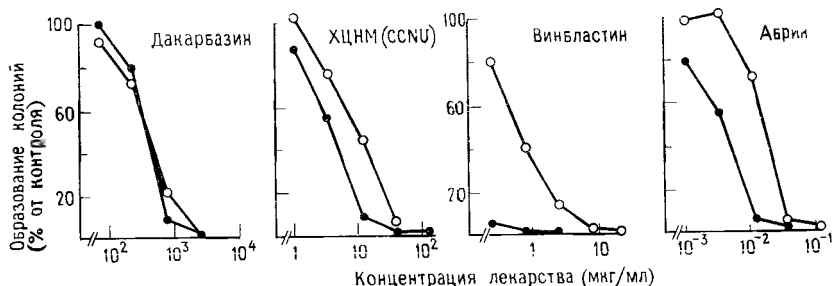


Рис. 8.2. Чувствительность клеток ксенотрансплантата меланомы (V.N.) к ряду лекарственных препаратов. Клетки выращивали в мягком агаре либо (а) по методу Куртений (○), либо (б) по методу Хэμβургера — Сальмона (●). Клетки обрабатывали лекарствами в течение 1 ч, высевали с плотностью $3 \cdot 10^4$ клеток на пробирку или чашку и через 14 дней проводили подсчет колоний. В контрольных культурах при использовании обоих методов насчитывалось ~ 400 колоний. Метод (б) обладает большей чувствительностью в трех из четырех случаев. (Воспроизводится с согласия издателей [26].)

ворить о способности клеток к самообновлению. Тем не менее рост в мягком агаре несомненно является полезной тест-системой для линий клеток с относительно высокой эффективностью клонирования. Однако при исследовании солидных опухолей и выпотов, выделенных от пациентов, возникает немало технических проблем, затрудняющих интерпретацию результатов. Перечислим лишь некоторые из этих проблем: из эпителиальных опухолей трудно получить гомогенную суспензию одиночных клеток (что является необходимым условием для определения эффективности клонирования); очень низкая эффективность клонирования (ниже 1%); образование колоний клеток, зависящих от субстрата при определенных условиях роста; потребность в большом числе клеток; субъективная оценка при подсчете колоний. Все это отражает несовершенство современной технологии, а не является недостатком данного метода. Важность разработки методов получения гомогенных суспензий клеток и подбора селективных культуральных сред для различных типов опухолей подчеркивалась в ряде работ [19]. В не-

скольких публикациях [20—22] можно найти критическое рассмотрение технических трудностей, возникающих при проведении программы «Испытания стволовых клеток опухоли человека». В недавнем обзорном сообщении [24] описаны результаты, полученные при использовании «двойного агарового метода», предложенного Хэмбургером с сотрудниками [23]. Альтернативная методология, обеспечивающая более высокую эффективность клонирования, впоследствии была предложена Куртней [25]. Твейт с сотрудниками [26] сравнили системы Хэмбургера — Сальмона и Куртней, и результаты их анализа показали, что используемая методология влияет на результаты определения чувствительности клеток к химиопрепаратам (рис. 8.2).

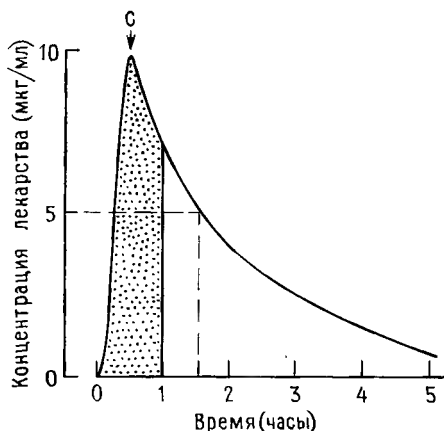


Рис. 8.3. Клиренс лекарственного препарата из плазмы при внутривенном введении. С — максимальная концентрация в плазме. $t_{1/2}$ — время полужизни лекарства. Точками выделена область под кривой для $T=1$ ч (мкг/мл/ч).

4. Концентрации лекарственных веществ

Выбор концентрации лекарства определяется тем, какие терапевтические уровни могут быть достигнуты при использовании тех или иных доз этого лекарства в клинике, что практически невозможно при предклини-

ческой проверке соединений на их возможную активность. Сравнивая данные об эффективной дозе того или иного вещества *in vitro* и *in vivo*, рекомендуется верхний предел концентрации 100 мкг/мл. Для многих используемых в клинике лекарств известны фармакокинетические данные, и для испытаний *in vitro* существенны такие параметры, как максимальная концентрация в плазме и кривая плазменного клиренса (рис. 8.3). Более подробное описание фармакокинетических проблем можно найти в работе [27]. В руководстве [28] приведены фармакокинетические данные для большинства противоопухолевых химиотерапевтических агентов и в том числе максимальная концентрация в плазме, показатель $C \times T$ (где C — концентрация и T — время в часах) и время полужизни ($t_{1/2}$) лекарства в плазме. При отсутствии фармакокинетических данных можно приблизительно оценить концентрацию вещества в плазме на основе вычислений, предполагающих равномерное распределение лекарства среди всех биологических жидкостей организма (табл. 8.1).

Таблица 8.1. Сравнение теоретической¹⁾ концентрации в плазме и фармакокинетических данных [28] для ряда противоопухолевых химиотерапевтических агентов

Лекарство	Доза	Теоретическая концентрация в плазме, мкг/мл	Измеренный параметр СХТ, мкг/мл/ч
Мелфалан	0,6 мг/кг	0,86	0,87—5,50
Цитозинарабинозид	10 мг/кг	14,29	15,23
BCNU ²⁾	2,25 мг/кг	3,21	1,02
5-Фторурацил	15 мг/кг	21,43	13—21
Цисплатин	100 мг/м ²)	3,8	1,42—2,52
Винбластин	0,2 мг/кг	0,29	0,116—0,254

¹⁾ Вычисления делались в расчете на возможного пациента весом 60 кг с 70%-ным жидкостным компартментом.

²⁾ 1,3-бис-(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина.

Естественно, что на основании выбранных концентраций всегда можно нарисовать график зависимости эффекта препарата от его концентрации; выбор тех или иных доз лекарственных веществ часто отражает чувствительность методов, выбираемых разными исследователями.

5. Продолжительность воздействия лекарственного препарата

Результаты фармакокинетических исследований показывают, что максимальный эффект лекарственного вещества проявляется в течение 1 ч после его внутривенного введения и по этой причине многими исследователями выбирается 1-часовой период воздействия. Это время оказывается достаточным для проявления действия алкилирующих агентов — препаратов, действующих в продолжение всего клеточного цикла. Для препаратов, действующих в определенной фазе клеточного цикла, таких как метотрексат и винбластин, требуется более долгий период воздействия в течение нескольких клеточных циклов. Было показано, однако, что увеличение периода воздействия многих противоопухолевых химиотерапевтических агентов приводит к постепенному снижению значения ИД₅₀ (дозы, ингибирующей жизнеспособность клеток на 50%) [29] (рис. 8.4). Лимитирующим фактором при коротких периодах воздействия может оказаться также скорость проникновения лекарства. Чувствительность клеток к кратковременному воздействию лекарства зависит также от метода исследования: после 1-часовой инкубации клеток с алкилирующими агентами отмечается высокий уровень гибели клеток при клонировании их в суспензии, а при клонировании их на стекле или пластике такая продолжительность воздействия оказывается неэффективной.

В конечном счете вопрос о длительности инкубации решается в каждом случае экспериментально. Если достоверный результат достигается после 1-часового воздействия, то этот период и следует использовать. Многие препараты необратимо связываются с компонентами клеток, так что истинная про-

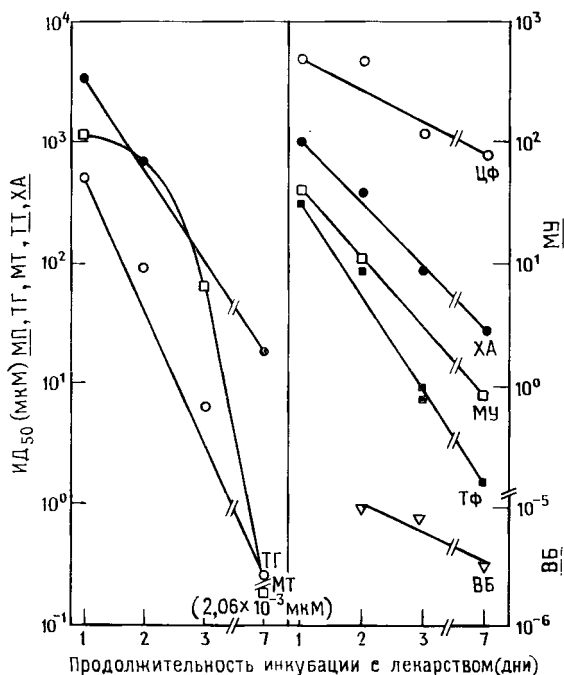


Рис. 8.4. Влияние продолжительности воздействия препарата на значение ИД₅₀ для 6-меркаптопурина (МП), тиогуанина (ТГ), метотрексата (МТ), циклофосамида (ЦФ), хлорамбуцила (ХА), мустина (МУ), тиофосамида (ТФ) и винбластина (ВБ) для клеток HeLa в тесте на микротитровальных пластинках (разд. 9.4.2). Лекарства заменяли на свежие каждые 24 ч, если чувствительность определяли через 48 и 72 ч, и через 24, 48 и 72 ч при 7-дневном испытании. На оси абсцисс показан разрыв между днями. (Воспроизводится с разрешения издателей [29]).

должительность воздействия может превышать 1 ч благодаря удержанию клетками лекарства. Действие других лекарств, например антиметаболитов и антитубулинов, оказывается преимущественно обратимым, если не задело чувствительной фазы клеточного цикла; в этом случае может потребоваться увеличение времени воздействия на один или несколько клеточных циклов. Резистентность клеток после короткого времени воздействия может означать, что клетки находились в неподходящей фазе клеточного цикла во время воздействия лекарства. Истинно

же резистентные клетки (то есть клетки, сохраняющие жизнеспособность после воздействия лекарства в течение чувствительной фазы цикла) могут быть однозначно выявлены только после достаточно длительного воздействия.

Независимо от выбранной продолжительности воздействия она должна сохраняться постоянной при сравнении действия

Таблица 8.2. Стабильность растворов некоторых противоопухолевых химиотерапевтических агентов при 37 °C¹⁾

Лекарство	Данные о стабильности	Ссылка
Адриамицин	Стабилен в течение 48 ч прединкубации	Вилсон (неопубликованные данные)
Блеомицин	—»—	
5-Фторурацил	—»—	
Цитозинарабинозид	—»—	
Цисплатин	Полная активность сохраняется 6 ч; полная утрата к 48 ч	
Фосфорамидный иприт	Полная активность сохраняется 24 ч; некоторая утрата к 48 ч	[29]
Мелфалан	Полная активность сохраняется 1 ч; полная утрата к 24 ч	
Хлорамбуцил	6-кратное снижение ИД ₅₀ после 24 ч	
Мустин	25-кратное снижение ИД ₅₀ после 24 ч	
ТиоТЭФ	1,38-кратное снижение ИД ₅₀ после 24 ч	
Циклофосфамид	3,5-кратное снижение ИД ₅₀ после 24 ч	
Вибластин	Отсутствие изменений ИД ₅₀ после 24 ч	

¹⁾ Автор, видимо, ошиблась в интерпретации результатов [29]. Хлорамбуцил, мустин, тиоТЭФ и циклофосфамид частично деградируют в ходе прединкубации, что приводит не к снижению, а к увеличению значений ИД₅₀ для этих соединений (на те же величины, которые приведены в таблице). — Прим. пер.

каждого лекарства на различные опухоли. При использовании продолжительного периода воздействия следует помнить, что теоретическое значение СХТ равно истинному значению СХТ только в том случае, когда лекарство сохраняет полную активность при 37 °C в течение промежутка времени, равного полному периоду воздействия, и величина ответа пропорциональна времени воздействия. В табл. 8.2 приведены результаты определения стабильности растворов некоторых лекарств при 37 °C. Эффективные концентрации лекарств могут снижаться также в результате их сорбции на поверхности сосудов для инкубации; это было отмечено в случае адриамицина и актиномицина D.

6. Восстановительный период

Наличие в испытании периода восстановления после действия лекарств существенно по трем причинам:

- I. если действие лекарственного препарата оценивается по подавлению им клеточного метаболизма, то анализ периода восстановления может вскрыть нарушения метаболизма, не имеющие отношения к гибели клеток;
- II. в течение этого периода могут репарироваться сублетальные изменения;
- III. может выявляться запаздывающая цитотоксичность (как, например, при действии 6-меркаптопурина и метотрексата).

Отсутствие в испытании периода восстановления может приводить либо к недооценке, либо к переоценке наблюдаемого уровня гибели клеток в зависимости от природы лекарства и от конечного результата испытания. Важно, чтобы период восстановления не был слишком продолжительным. В противном случае гибель клеток может маскироваться разрастанием резистентной популяции. При анализе количества клеток или включения предшественников клетки в монослое должны оставаться на логарифмической фазе роста в течение периода воздействия лекарства и восстановительного периода. В тестах на эффективность клонирования период восстановления представляет собой период роста клонов. Время, необходимое для образования видимых колоний, составляет в суспензионных тестах как минимум 5—6 генераций (32—64 клетки на колонию). В монослойных тестах этот период бывает обычно значительно более продолжительным.

7. Конечный результат

7.1. Цитотоксичность, жизнеспособность и выживаемость

Результаты исследования определяются тестами на цитотоксичность и тестами, в которых анализируется выживание клеток. В тестах на цитотоксичность определяют индуцированные лекарствами изменения в метаболических путях или структурной целостности, которые могут иметь и не иметь непосредственного отношения к гибели клеток. В тестах на выживание определяется конечный результат метаболических нарушений, которые могут приводить либо к восстановлению клеток, либо к их гибели. Теоретически единственным достоверным показателем выживаемости пролиферирующих клеток является способность их к дальнейшему размножению, что определяется клонированием клеток. В качестве показателя выживаемости могут быть

использованы и метаболические признаки, особенно когда клеточной популяции предоставляется время для метаболического восстановления после воздействия лекарства.

Иногда исследуемый препарат обладает неспецифической цитотоксичностью (то есть токсичностью, не влияющей непосредственно на размножение клеток); обработка таким соединением ведет к потере ряда клеточных функций, но не к потере репродуктивной способности. Тесты на цитотоксичность представляются в этой ситуации более приемлемыми.

7.2. Цитотоксичность и жизнеспособность

В некоторых тестах на цитотоксичность, таких как поглощение красителя мертвыми клетками или высвобождение ^{51}Cr или флуоресцеина из предварительно меченых клеток, результаты можно получить немедленно. Эти испытания относятся к тестам на жизнеспособность и предназначены скорее для предсказания выживаемости, чем для ее прямого измерения. В целом такие тесты хороши для идентификации погибших клеток, но приводят к завышенным результатам при оценке длительного выживания. Результаты большинства из них отражают нарушение целостности мембран и необратимую гибель клеток.

Другие признаки цитотоксичности, оцениваемые по изменению метаболических процессов, могут быть измерены более точно. Однако предсказание выживаемости клеток на основе этих параметров может быть более неопределенным, поскольку многие формы подавления метаболизма оказываются обратимыми. В этих случаях угнетение выживания клеток может реализоваться, только если подавление скорости включения предшественников в ДНК, РНК или белок будет постоянным в течение нескольких клеточных циклов.

7.2.1. Целостность мембран

Этот тест относится к наиболее распространенным методам оценки жизнеспособности клеток непосредственно во время опыта. Результаты исследования позволяют оценивать мгновенные повреждения (например, при замораживании и оттаивании клеток) или повреждения, прогрессирующие в течение нескольких часов. Их количественная оценка может быть затруднена вследствие потери погибших клеток из-за открепления от субстрата или аутолиза.

I. Высвобождение ^{51}Cr . Обработка клеток ^{51}Cr приводит к ковалентному связыванию хромата основными аминокислотами внутриклеточных белков. Эти меченые белки высвобождаются из клеток при повреждении клеточных мембран; скорость высвобождения пропорциональна степени повреждения. Метод

нашел широкое применение в иммунологических исследованиях для определения активности цитотоксических Т-клеток против опухолевых клеток-мишеней. Естественное высвобождение ^{51}Cr из неповрежденных клеток оказывается достаточно высоким, так что опыт следует проводить в течение не более 4 ч после загрузки клеток ^{51}Cr . Результаты сравнительного исследования [34], использующего высвобождение ^{51}Cr в качестве конечного продукта цитотоксического действия лекарств, показали непригодность этого метода для оценки истинной цитотоксичности.

II. Отторжение красителя. К прижизненным красителям, используемым для оценки целостности мембран, относят трипановый синий, эозин Y, нафтоловый черный, нигрозин (зеленый), эритрозин В и зеленый прочный. Для оценки жизнеспособности более надежным способом является окрашивание клеточных суспензий, поскольку при окрашивании прикрепленных клеток они могут открепляться от субстрата и теряться. Главным недостатком этого метода является невозможность выявления клеток с нарушенной способностью к размножению. Так, было показано, что клетки, не способные к клонообразованию, характеризуются 100%-ной выживаемостью при тестировании на отторжение красителя [34]. Метод, однако, удалось обновить, и введенные в него технические усовершенствования позволили в какой-то степени разрешить присущие ему проблемы. В методе, предложенном Вейзенталем с сотрудниками [35], выбран 4-дневный период исследований, в течение которого клетки с нарушенной способностью к размножению теряют целостность мембран.Arteфакты, связанные с размножением жизнеспособных клеток или лизисом погибших клеток, корректируются путем добавления в суспензию фиксированных утиных эритроцитов в качестве внутреннего стандарта. При сравнении трех методов анализа: подсчет клеток, определение жизнеспособных клеток и определение отношения числа жизнеспособных клеток к числу эритроцитов — выявляется повышенная чувствительность последнего метода (рис. 8.5). Этот метод с равным успехом был применен к солидным опухолям, клеткам выпотов и злокачественным клеткам крови.

7.2.2. Дыхание и гликолиз

Изменения дыхания (поглощение O_2) или гликолиза (образование CO_2), индуцируемые лекарствами, оценивают с помощью аппарата Варбурга; оба этих параметра характеризуются подавлением, зависимым от дозы лекарства [31, 32]. Ряд авторов определяет активность дегидрогеназы, смешивая метиленовую синьку с агаром, содержащим клетки, обработанные лекарством. Гибель клеток регистрируется по отсутствию восстановления красителя в их окрестностях [33]. Недостаток послед-



Рис. 8.5. Влияние доксорубина (0,12 мкг/мл/ч) на клетки MDAY-D2, оцениваемое с помощью трех различных методов. Подсчет в автоматическом счетчике частиц Каулер (—) (по оси ординат отложено количество клеток/мл $\times 10^4$); отношение числа живых опухолевых клеток к числу утиных эритроцитов, нормированное к той же шкале, что и подсчеты в счетчике Каулер (---); доля жизнеспособных клеток в % (— · — · —). По оси ординат отложен % жизнеспособности (число живых клеток/общее число $\times 100\%$). ● — контрольные культуры; ○ — обработанные доксорубином культуры. (Воспроизводится с разрешения издателей [35].)

него метода заключается в невозможности количественного его осмысления, тогда как использование аппарата Варбурга, хотя и позволяет получить количественные оценки, но не находит широкого распространения из-за технических трудностей.

7.2.3. Включение радиоактивных изотопов

Для проверки цитотоксичности тех или иных препаратов часто применяют метод включения радиоактивных изотопов.

I. Нуклеотиды. Наиболее широко используемыми методами количественной оценки цитотоксичности лекарственных веществ являются определения включения ^3H -тимидина в ДНК и ^3H -уридина в РНК [10, 13, 14, 16]. В кратковременных опытах без периода восстановления эти методы страдают рядом недостатков, связанных с тем, что включение ^3H -тимидина не всегда отражает истинную способность клеток синтезировать ДНК. К числу этих недостатков относятся следующие.

- I. наблюдаемые изменения могут отражать изменения внутриклеточных пулов нуклеотидов, а не изменения синтеза ДНК;
- II. некоторые препараты, такие как 5-фторурацил и метотрексат, подавляющие путь биосинтеза нуклеотидов *de novo*, могут увеличить включение ^3H -тимидина благодаря его переносу по «запасному» пути, использующему преформированные пиримидины;
- III. синтез ДНК может происходить и в отсутствие включения ^3H -тимидина [36].

Выбор изотопа оказывается в некоторой степени зависимым от типа используемого лекарственного препарата. Так, Вольм с сотрудниками [13] рекомендуют при исследовании действия адриамицина ^3H -уридин, 4-гидроксипероксициклофосамида — ^3H -тимидин, 5-фторурацила — ^3H -дезоксисуридин. С другой стороны, в работах Сильвестрини [10] было отмечено, что при оценке действия адриамицина, 4-гидроксипероксициклофосамида, цисплатина и митомицина наблюдается сходное снижение включения и ^3H -тимидина, и ^3H -уридина. При исследовании действия блеомицина, винкристина, актиномицина D и VP-16 включение предшественников было различным. Низкий уровень включения нуклеотидов в опухоли человека делает необходимым использование большого количества клеток, что приводит к ограничению спектра испытываемых лекарств и диапазона их концентраций, если количество клеток лимитировано. Недавно появились сообщения о двух «гибридных» методах, сочетающих в себе преимущества «подавления клеток стромы» культивированием в мягком агаре и количественной оценки, обеспечиваемой применением радиоизотопов. Оба метода требуют промежуточного времени проведения (~ 4 сут) и используют включение ^3H -тимидина в ДНК. В одном методе клетки выращивают в суспензии над мягким агаром [37], а во втором клетки растут непосредственно в мягком агаре [38].

Если возможно получение гомогенных клеточных популяций, то включение ^3H -нуклеотидов может быть использовано после соответствующего периода восстановления для определения выживаемости или же в присутствии лекарства для измерения его антиметаболического эффекта, но с учетом указанных выше ограничений.

II. ^{125}I -йодурацилдезоксирибозид (^{125}I -ЙУДР). ^{125}I -ЙУДР представляет специфическую стабильную метку для новообразованной ДНК, которая минимально реутилизируется и, следовательно, может быть использована для определения скорости синтеза ДНК в течение 24 ч [39]. Количественная оценка процесса облегчается тем, что изотоп является γ -излучателем. К недостаткам следует отнести неодинаковую токсичность препарата для различных клеточных популяций; ^{125}I -ЙУДР необходимо исполь-

зовать в низких концентрациях, а следовательно, приходится брать для анализа больше клеток.

III. ^{32}P -фосфат (^{32}P). Скорость высвобождения ^{32}P в среду из клеток зависит от типа исследуемых клеток и увеличивается в результате их повреждения. Этот факт был использован для оценки эффективности действия лекарств [40]. По включению ^{32}P в нуклеотиды можно судить и о цитотоксичности лекарственных препаратов. Однако в настоящее время ни один из этих методов не нашел пока широкого применения.

IV. ^{14}C -Глюкоза. Включение глюкозы используется в качестве конечного результата при исследовании цитотоксичности лекарственных веществ, поскольку она является общим предшественником многих биохимических путей [42]. Метод не имеет широкого распространения.

V. ^3H -Аминокислоты. Синтез белка можно рассматривать как незаменимый метаболический процесс, без которого клетка теряет жизнеспособность, поэтому включение аминокислот в белки успешно используется в качестве оценки цитотоксичности. Наиболее распространены исследования клеток, растущих в монослое в лунках микротитровальных пластинок. В этом случае можно оценивать включение ^3H -лейцина [29] с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика или включение ^{35}S -метионина с помощью радиоавтографии [43].

7.3. Выживаемость (репродуктивная целостность)

Исследования выживаемости позволяют непосредственно изучать гибель размножающихся клеток путем определения эффективности клонирования в монослое или в мягком агаре. Конечные результаты, описанные в предыдущем разделе, могут быть использованы в качестве показателя репродуктивной целостности, если при испытании анализируется также и восстановительный период. Увеличение количества общего белка, числа клеток и белоксинтезирующей активности также может отражать способность к пролиферации. В этих случаях интерпретация более сложна, так как гетерогенная клеточная популяция по-разному реагирует на разные воздействия.

7.3.1. Клонирование в монослое

Эффективность клонирования клеток в монослое, как правило, выше, чем в мягком агаре, поэтому этот метод часто используется при работе с линиями клеток. Нормальные и опухолевые клетки могут образовывать колонии в монослое, так что этот метод неприменим к биопсийному материалу опухолей, который обычно характеризуется высоким уровнем примесей клеток стромы. Метод клонирования в монослое биопсий опухолей

возможен, если есть способ различать опухолевые клетки и клетки стромы. Для увеличения эффективности посева часто используется фидерный слой облученных или обработанных митомином С клеток; улучшение условий культивирования благодаря наличию фидерных клеток часто оказывается благоприятным для выявления небольших фракций клеток, резистентных к лекарственным препаратам [44].

7.3.2. Клонирование в мягком агаре

Достоинства и недостатки этого метода обсуждались уже в разд. 3.1.5.

7.3.3. Сфероиды

Для количественной оценки действия лекарств на сферoidalный рост клеток можно использовать разные методы. К числу таких методов относятся:

- I. относительные изменения объемов обработанных и необработанных сфероидов;
- II. эффективность клонирования дезагрегированных сфероидов в мягком агаре;
- III. пролиферация клеток из сфероидов, прикрепленных к поверхности культурального сосуда.

Первый метод относительно малочувствителен, поскольку рост сфероидов имеет тенденцию к насыщению. Сложность дезагрегации до суспензии одиночных клеток и низкая эффективность посева делают трудным и второй метод. Конечный результат определяется главным образом индивидуальными особенностями изучаемых сфероидов.

7.3.4. Пролиферация клеток

Увеличение количества клеток в пролиферирующей клеточной линии можно рассматривать как показатель нормального поведения. Можно построить кривые роста культуры и определить время ее удвоения на стадии экспоненциального роста. Увеличение времени удвоения может служить указанием на цитотоксичность, хотя следует помнить, что получаемые результаты отражают усредненные параметры, поэтому на основании этих данных нельзя отличить снижение скорости роста всех клеток от гибели части клеток в каждой клеточной генерации. Для оценки цитотоксичности по изменению числа клеток в массовой культуре следует рассматривать всю кривую роста. Если 50% клеток гибнет в начале эксперимента, то скорость роста оставшихся клеток, определяемая на логарифмической фазе, может оказаться неизменной, но характеризоваться некоторым

Таблица 8.3. Обобщение результатов исследований, предпринятых для сравнения результатов по эффективности клонирования и цитотоксичности

Авторы	Сравниваемые методы	Использованные клетки	Результаты
Ропер, Древнико [34]	Высвобождение ^{51}Cr , отторжение красителя, индекс метки, кинетика роста	Лимфома T_1	Эффективность клонирования — единственный достоверный зависимый от дозы показатель эффекта лекарственных препаратов
Твейт с со-трудниками [26]	Системы «Куртеией» и «Салмой» в мягком агаре	Меланома: ксено-трансплантаты и биопсийный материал	Результаты чувствительности несовпадают. Система «Салмой» обеспечивает большую чувствительность
Морган с со-трудниками [18]	Клонирование в монослое и микротитровальный тест (разд. 9.4.2 и 9.4.3)	Астроцитома человека	Хорошая корреляция. Метод клонирования позволяет выявить небольшие фракции резистентных клеток
Вилсон с со-трудниками [45]	Кратковременное биохимическое испытание и микротитровальный тест (разд. 9.4.4)	Линии клеток (T13 и MCF 7)	Результаты сравнения зависят от лекарства и продолжительности воздействия Точки отсечения, выбираемые по результатам предварительных данных, дают сравнимые результаты
Вейзенталь с со-трудниками [17]	Отторжение красителя	Линии клеток опухолей животных	Качественное соответствие результатов по отторжению красителя и определению эффективности клонирования
Фридман и Глаубигер [37]	Определение включения ^3H -тимидина в суспензии над мягким агаром	Биопсийный материал опухолей человека	89% корреляции между включением тимидина и испытанием по программе «Стволовые клетки опухолей человека»

запаздыванием. На практике оказывается очень трудно различить раннюю потерю клеток и увеличение лаг-периода, в течение которого клетки просто адаптируются. По этим причинам изменение скорости роста клеток следует рассматривать только как намек на возможность цитотоксического действия, и точное

определение выживания и пролиферации клеток следует проводить на основе эффективности клонирования (выживание) и определения размера колоний (пролиферация).

7.3.5. Общее содержание белка

Определение количества белка является относительно простым методом оценки числа клеток. Этот метод особенно удобен в монослойной культуре, и важное его преимущество заключается в том, что промытые препараты могут храниться долгое время в замороженном виде; это не искажает конечный результат и облегчает скрининг. Завышенная оценка числа клеток может иметь место при изучении действия некоторых препаратов, подавляющих репликацию, но не влияющих на синтез белка (например, 5-бромдезоксипуридин и метотрексат). Для монослойной культуры была разработана специальная модификация метода Лоури, использующая феноловый реагент фолина [30]. Рекомендуются также метод с амидо-черным, при котором линейность стандартной кривой сохраняется в более широком диапазоне концентраций [3]. Вывод о цитотоксичности при использовании этого метода можно делать, если изменение накопления белка в культуре в течение времени показано в нескольких точках; если же точка одна, то воздействие лекарственного препарата должно быть длительным и должен существовать период восстановления.

8. Сравнение систем исследования

Несмотря на различие методов, используемых для определения цитотоксичности и жизнеспособности, при их применении к биопсийному материалу опухолей человека, были получены одни и те же уровни корреляции между чувствительностью *in vitro* и ответами *in vivo*. Было проведено немало сравнительных анализов, при которых в качестве стандарта для сравнения выбирался процесс образования клонов. В табл. 8.3 обобщены результаты этих исследований. Оказалось, что при адекватном определении цитотоксичности результаты совпадают с данными теста на клоногенность.

9. Технические советы

9.1. Лекарственные препараты и их растворы

9.1.1. Источники лекарств

Фармацевтические препараты для внутривенного введения часто содержат различные добавки, которые сами по себе являются цитотоксичными. Такие препараты, следовательно, не-

пригодны для отбора образцов по весу, а если они и используются в качестве исходных растворов, то следует проводить определение цитотоксичности добавочных компонентов в используемых системах анализа. Эти проблемы легко обойти, если использовать чистые соединения, получаемые от производителей лекарств.

9.1.2. Хранение

Рекомендуется хранить сухие соединения в эксикаторах над поглотителями влаги при температуре от -20° до -70°C . Это особенно важно для соединений, нестабильных в водных растворах. На практике часто используется приготовление концентрированных растворов лекарств, которые затем разливаются на порции и хранятся при -70°C . Хранение при более высоких температурах не рекомендуется, а часть лекарств (нитрозомочевины) оказывается нестабильной даже при таких условиях [46]. Некоторые лекарства могут связываться с обычно используемыми фильтрами из нитрата или ацетата целлюлозы, и стерилизация их растворов фильтрованием должна проводиться в контролируемых условиях, позволяющих определять связывание лекарства. Рекомендуется использовать максимально высокие концентрации лекарств и максимальные объемы раствора, чтобы насыщать фильтр первыми несколькими миллилитрами фильтрата, которые затем могут быть отброшены. С другой стороны, можно использовать неадсорбирующие фильтры, например фильтры из нейлона. Во всех случаях следует проверять фильтрат, чтобы убедиться, что активность не потеряна. Как показал опыт практической работы, подготовка нефармацевтических препаратов чистых лекарств в асептических условиях (т. е. взвешивание на стерильных подложках и растворение в стерильных контейнерах) обеспечивает отсутствие загрязнений даже в продолжительных экспериментах.

9.1.3. Растворители

I. Органические растворители. В табл. 8.4 представлены растворители, которые могут быть использованы для большинства химиотерапевтических противоопухолевых агентов. Для предотвращения цитотоксичности этанола его следует разводить в 1000 раз. ДМСО, как правило, не цитотоксичен в разведении 1:100, но некоторые первичные культуры опухолей человека чувствительны к этому соединению. Следовательно, при исследовании материала первичных культур всегда следует проводить контрольные проверки токсичности растворителя.

II. *Компоненты среды.* Некоторые лекарства прочно связываются с сывороточными белками (например, цисплатин), и присутствие сыворотки в культуральной среде может, следовательно, снизить действующую концентрацию препарата. Влияние сыворотки (в концентрации 5—20%) на чувствительность клеток к цисплатину зависит от продолжительности воздействия (рис. 8.6 А и Б). Так, при 3-часовом воздействии лекарства на

Таблица 8.4. Растворители для лекарств, используемых в химиотерапии рака

Растворимые в водных растворах	Нерастворимые	Используемые растворители
Адриамицин Актиномицин D Блеомицин Митомицин C Цитозинарабинозид 5-Фторурацил Метотрексат Винбластин Винкристин ТиоТЭФ Цисплатин	Хлорамбуцил Мелфалан 1,3-бис-(2-хлорэтил)- 1-нитрозомочевина (BCNU) (2-хлорэтил)-3-цикло- гексил-1-нитрозомоче- вина (CCNU)	2% HCl: 98% этанола. Разводятся с 4,5 объ- емами пропан-1,2-дио- ла и 4,5 объемами со- левого раствора или ДМСО 0,1 M HCl или ДМСО Этанол
4-Гидропероксицикло- фосфамид		Этанол в сочетании с 1 объемом 5%-ного твина 80 и 1 объемом фосфатного буфера
Прокарбазин	Гексаметилмеламин 6-Меркаптопурии	ДМСО или гомогениза- ция в ДМСО с 9 объ- емами 5%-ного твина 80 в солевом раство- ре ДМСО

клетки они оказываются наиболее чувствительными при низкой концентрации сыворотки. Если продолжительность воздействия цисплатина увеличить до 48 ч, то клетки оказываются одинаково чувствительными при всех концентрациях сыворотки (Вилсон, неопубликованные данные).

Компоненты некоторых сред могут защищать клетки от цитотоксического действия антиметаболитов. Так, например, тимидин и гипоксантин защищают клетки от действия метотрексата, а тимидин, кроме того, предотвращает действие 5-бром-дезоксинуридина и 5-фтордезоксинуридина. В работе [3] приведен внушительный список компонентов среды, защищающих клетки от антиметаболитов. Рассмотрение этого аспекта особенно важно при скрининге новых противоопухолевых агентов с возможной цитотоксической активностью.

9.1.4. Активация лекарственных препаратов

Многие соединения, не являющиеся токсичными сами по себе, превращаются в цитотоксичные метаболиты благодаря системе оксидаз цитохрома Р-450, локализованной в печени. Наиболее широко известным химиотерапевтическим противоопухолевым агентом, требующим активации *in vivo*, является циклофосфамид. Разработан метод получения активных метаболитов из мочи пациентов, леченных циклофосфамидом; кроме

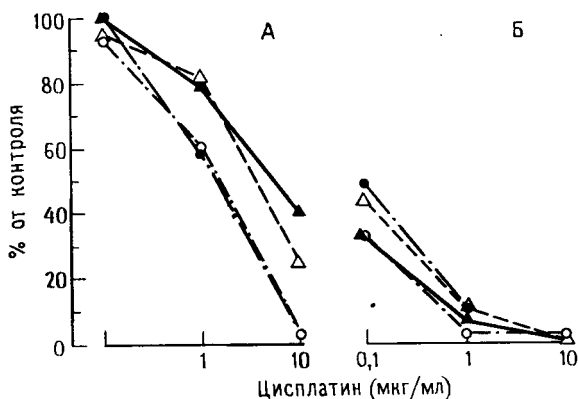


Рис. 8.6. Влияние сыворотки на чувствительность клеток опухоли яичников (линия ОАW42) к цисплатину, измеряемую с использованием испытания на микротитровальных пластинках (разд. 9.4.2). Экспоненциально растущие клетки обрабатывали цисплатином в течение 3 ч с 72-часовым восстановительным периодом (А) или в течение 48 ч с 24-часовым восстановительным периодом (Б). ○ — среда без сыворотки; ● — 5% сыворотки; △ — 10% сыворотки; ▲ — 20% сыворотки. Средиеквadraticное отклонение менее $\pm 10\%$. (Э. Вилсон, неопубликованные данные.)

того, предложен метод активации лекарства *in vitro* с использованием микросомальной фракции S9 из печени крыс, получавших фенобарбитал. В последнее время получены чистые препараты фосфорамидного иприта и 4-гидропероксициклофосфамида, и, хотя нельзя еще достоверно утверждать, который из метаболитов обладает противоопухолевой активностью *in vivo*, полученные экспериментальные данные позволяют думать, что таким метаболитом является скорее всего 4-гидропероксициклофосфамид [47].

В настоящее время разрабатываются другие методы активации *in vitro* с использованием культивируемых гепатоцитов крыс или биопсийного материала печени человека. Использование интактных клеток, в которых уровень кофакторов приближен к ситуации *in vivo* и оказывается достаточно высоким для поддержания определяемых этими кофакторами реакций, обеспечивает более близкое приближение к картине, наблюдаемой

in vivo, и несомненно может привести к получению результатов, отличающихся от полученных при использовании гомогенатов печени. В составе системы цитохрома Р-450 обнаружены видо-вые различия, использование гомогенатов печени человека поэ-тому сближает картины *in vitro* и *in vivo*. Важно помнить, однако, что существуют также и индивидуальные различия в метаболической активности этой системы. Эти аспекты более подробно рассмотрены в других работах [48, 49].

9.2. Инкубация с лекарствами

Наиболее распространенная процедура заключается в инкубации клеток с раствором лекарства сразу после ферментативной дезагрегации солидной ткани или сбора клеток путем трипсинизации монослоя. Имеются, однако, данные о том, что чувствительность клеток к лекарству изменяется в результате ферментативной обработки и сохраняется изменившейся в течение по крайней мере 12 ч после обработки ферментом [50]. В связи с этим следует предусмотреть в опыте прединкубационный период для свежевыделенных клеток, чтобы дать им восстановиться после действия трипсина. В течение всего периода инкубации необходимо поддерживать клетки при рН 7,4, поскольку изменения рН влияют на рост клеток, а щелочной рН особенно неблагоприятно сказывается на жизнеспособности клеток.

Сравнение статических и нестатических условий инкубации клеточной суспензии выявляет существенные различия в характере кривой зависимости эффекта препарата от его концентрации [51]. Поэтому клетки следует постоянно поддерживать в суспендированном состоянии для равномерного распределения лекарства. Если отношение площади поверхности к глубине среды в культуральном сосуде невелико, то инкубация в водяной бане на мешалке не обеспечивает поддержания клеток в суспензии, и в этом случае рекомендуется периодически встряхивать сосуд рукой (например, каждые 10 мин).

9. 3. Тесты, основанные на определении выживаемости и пролиферативной способности

9.3.1. Эффективность клонирования

Одним из наиболее широко распространенных тестов на цитотоксичность является определение способности одиночной клетки к образованию колонии. Это достигается простым разведением суспензии одиночных клеток, а выживание определяется подсчетом образуемых этими клетками колоний. В зависимости от времени удвоения изучаемых клеток и общей продолжитель-

ности опыта устанавливается нижний порог чувствительности, за который обычно принимается пять или шесть клеточных удвоенный (32 или 64 клетки на колонии).

Некоторые лекарства оказывают влияние не только на пролиферацию, а также и на выживаемость как таковую (в некоторых случаях — только на выживаемость). Поэтому иногда необходимо анализировать не только число колоний, но и их размер. Так, подсчитывается количество клеток в колонии (трудоемкая операция, возможная только в случае небольших колоний), определяется диаметр колоний (способ неточный, так как клетки отличаются по размеру и по характеру расположения в колонии); кроме того, можно определять светопоглощение колоний, окрашенных 1%-ным кристаллфиолетом.

1. Клонирование в монослое. Клетки, способные к адгезии, высеваются на плоскую поверхность стекла или пластика для культуры ткани, где они растут и образуют колонии, которые могут быть окрашены и просчитаны. Если исследуется высокотоксичное лекарственное средство, обработку им лучше проводить до посева клеток. Для менее токсических веществ, требующих постоянного воздействия на клетки, возможно внесение его через 24—48 ч после посева клеток, и при этом его можно держать в культуре в течение всего периода клонального роста при условии стабильности этого вещества.

1. Подготовьте парные флаконы с площадью поверхности 25 см² (по два на каждую исследуемую концентрацию лекарства и два для контрольных клеток).
2. Когда культуры достигнут желаемой стадии роста (обычно это середина логарифмической фазы, но иногда это может быть стационарная фаза), добавьте лекарственный препарат в экспериментальные флаконы и растворитель в контрольные. Инкубируйте 1 ч при 37°C.
3. Слейте среду, содержащую препарат, сполосните монослой ФСБ и приготовьте суспензию одиночных клеток путем обычной трипсинизации (см. гл. 1).
4. Подсчитайте количество клеток в каждой суспензии и разведите до концентрации, обеспечивающей образование 100—200 колоний в чашках Петри диаметром 5—6 см. Эта величина зависит от эффективности посева клеток и от действия лекарства. При посеве контрольных, не обработанных лекарством клеток, обладающих эффективностью посева 20%, на чашку следует высевать 500—1000 клеток. После воздействия лекарства в дозе ИД₅₀ следует высевать 1000—2000 клеток на чашку, а после действия лекарства в концентрации ИД₉₀ следует высевать по 5000—10 000 клеток на чашку. Вначале следует провести пробные посевы:

а) для определения эффективности посева клеток,

б) для приблизительного определения значений ID_{50} и ID_{90} данного препарата.

В практической работе клетки рассеивают в двух разных концентрациях; при одной плотности посева получают примерно ожидаемое число колоний контрольных клеток и клеток, обработанных низкими дозами лекарства, при второй высевают клетки, обработанные высокими дозами лекарства. В среднем диапазоне концентраций лекарственного вещества должно быть некоторое перекрывание наборов чашек, и положение этого перекрывающего диапазона подсказывается обычно опытом исследователя.

5. Посейте соответствующее количество клеток в чашки и поместите их в термостат с 5% CO_2 при 37 °C.
6. Выращивайте клетки вплоть до образования колоний. Для быстро растущих клеток (время удвоения 15—24 ч) образование колоний происходит в течение 7—10 сут, а для медленно растущих клеток (время удвоения 36—48 ч) требуются 2—3 нед. Как правило, при исследовании на выживаемость колонии должны содержать в среднем 1000 и более клеток (10 генераций). По мере увеличения размера колоний скорость их роста замедляется (особенно в случае нормальных клеток), поскольку колонии приобретают тенденцию роста с краев, а более медленно растущие колонии уплотняются. Поэтому если главным исследуемым параметром является пролиферация клеток (размер колоний), то клональный рост следует оценивать после более короткого периода инкубации, когда колонии имеют меньший и более широко варьирующий размер.
7. Ополосните чашки ФСБ, зафиксируйте метанолом или глутаровым альдегидом и окрасьте 1%-ным кристаллвиолетом. Промойте проточной водопроводной водой, затем дистиллированной водой и высушите.
8. Подсчитайте колонии, превышающие размером нижнюю пороговую величину и переведите полученные результаты в проценты от контроля. Постройте график зависимости полученных значений в логарифмической шкале от концентраций лекарства.

II. *Эффективность клонирования в мягком агаре с использованием системы двойного агарового слоя.* Приведенная процедура использует 1-часовой период обработки лекарством и требует четырех повторов на каждую экспериментальную точку.

1. Подготовьте чашки Петри диаметром 35 мм с 1 мл базального слоя 0,5%-ного агара в ростовой среде. Для этого 1%-ный агар (расплавленный путем кипячения или автоклавирования) смешайте при 45 °C с равным объемом ростовой среды двойной концентрации и предварительно протертой пипеткой разлейте на чашки по 1 мл.

2. Приготовьте суспензию одиночных клеток из популяции, выбранной в качестве мишени (см. гл. 1 и 6). Концентрация клеток в ростовой среде должна в 20 раз превышать конечную концентрацию, используемую для посева; суспензию клеток вплоть до использования следует хранить при 4°C.
3. Приготовьте разведения исследуемого препарата в ростовой среде в объеме 900 мкл каждой концентрации в парных пробирках, включая контрольные пробирки, содержащие только среду и соответствующие контроли с растворителем. Поскольку клетки обрабатываются несколькими исследуемыми лекарствами в широком диапазоне концентраций и опыт занимает значительное время, рекомендуется проводить дополнительные контрольные посевы в начале, в середине и в конце каждого эксперимента. Такие контроли помогут скорректировать вариабельность результатов, обусловленную длительным периодом проведения опыта.
4. Убедитесь, что исходная суспензия по-прежнему представлена отдельными клетками, и внесите в каждую пробирку по 100 мкл суспензии клеток.
5. Инкубируйте пробирки при 37°C в течение 1 ч (см. разд. 9.2).
6. По окончании инкубации осадите клетки центрифугированием (2 мин при 100 g) и промойте их 5 мл солевого раствора. Повторите процесс отмывания и суспендируйте осадок клеток в 2 мл ростовой среды. Для поддержания жизнеспособности клеток в ходе опыта храните их во льду.
7. Центрифугируйте пару пробирок с одной концентрацией лекарства. Удалите среду и добавьте в каждую пробирку по 2 мл теплой свежей среды, содержащей 0,3% агара. Осторожно суспендируйте клетки так, чтобы не осталось агрегатов, и посейте по 1 мл суспензии на каждую из 4 подготовленных чашек с агаром. Эту процедуру легче всего производить с помощью микропипеток на 1 мл (Finn или эквивалентные им пипетки). Для удобства работы с затвердевающим агаром у таких пипеток следует отрезать кончик (~2 мм).
8. Поместите чашки на охлаждаемую горизонтальную поверхность для затвердевания агара.
9. Повторите операцию для всех условий воздействия, включая контрольные суспензии на соответствующих этапах опыта.
10. Инкубируйте чашки во влажной атмосфере 95% воздуха и 5% CO₂.
11. Когда колонии в контрольных чашках дорастут до заданного размера, подсчитайте их число. При работе с линия-

ми клеток колонии должны содержать более 50 клеток. Медленно растущие клетки с низкой эффективностью посева (клетки биопсий опухолей человека) обычно образуют колонии из 20—30 клеток.

III. Модификации

1. *Метод «Куртений».* Для клонирования клеток в суспензии [51] в качестве фидерных клеток используются эритроциты крыс и поддерживается парциальное давление кислорода 5%. Может быть использована описанная выше процедура с соответствующими модификациями условий окончательного посева.
2. *Фидерные клетки.* При увеличении количества клеток может не соблюдаться пропорциональность между эффективностью посева и числом высеваемых клеток. Когда под действием лекарств происходит лизис клеток, то снижение их числа может сопровождаться непропорциональным снижением эффективности посева, что скажется на наблюдаемой эффективности клонирования значительно сильнее, чем снижение клоногенности остающейся популяции клеток. Эта проблема может быть решена путем использования гомологичных фидерных клеток. Эти клетки не пролиферируют, поскольку облучены летальными дозами ^{60}Co или ^{137}Cs или проинкубированы в течение 12 ч с митомицином (2 мкг/ 10^6 клеток). Дозу облучения следует экспериментально устанавливать для каждого типа клеток (например, 2000—3000 рад для лимфоцитов и 6000 рад для линий лимфоидных клеток).
3. *Использование 2-(п-иодофенил)-3-(п-нитрофенил)-5-фенил тетразолийхлорида (ИНТХ).* Живые клетки восстанавливают бесцветные соли тетразолия до водонерастворимых окрашенных формозановых соединений. Эта реакция используется при подсчете для дифференциации колоний жизнеспособных клеток и агрегатов погибших клеток. Следует иметь в виду, что жизнеспособные колонии могут дегенерировать из-за истощения среды, что иногда искажает конечные результаты. Краситель готовится путем растворения ИНТХ-фиолетового в забуференном солевом растворе в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Растворение происходит медленно, так что краситель следует начинать готовить за 24 ч до использования. В каждую чашку Петри диаметром 35 мм добавляют 0,5—1 мл красителя и инкубируют в течение ночи при 37°C. Живые колонии окрашиваются в красновато-коричневый цвет.
4. *20% O_2 или 5% O_2 .* Для проведения клоногенных исследований рекомендуется более низкое парциальное давление кислорода, которое ближе к физиологическому. При снижении концентрации кислорода увеличивается эффек-

тивность клонирования. Показано, что кислород модифицирует чувствительность клеточных популяций к химиотерапевтическим препаратам [52], усиливая их цитотоксическое действие.

9.3.2. Сфероиды

Приведенная ниже экспериментальная методика основана на технике, описанной в недавней публикации [53]. Для определения цитотоксического эффекта лекарств на сфероиды могут быть использованы три конечных критерия: (а) замедление роста объема; (б) рост клонов; (в) разрастание клеток в форме монослоя. Независимо от выбранного нами критерия начальные этапы испытания (предварительный отбор сфероидов одинакового размера и инкубация с лекарством) оказываются общими.

- I. Предварительный отбор сфероидов определенного размера. Сфероиды с диаметром 150—250 мкм видны невооруженным глазом и отбираются с помощью пастеровской пипетки.
- II. Процесс инкубации с лекарством в известной степени зависит от продолжительности воздействия. Если препарат добавляется на 1 ч, что случается наиболее часто, сфероиды инкубируют в чашках Петри или универсальных стеклянных контейнерах, покрытых агаром (0,5—1%). При более длительном воздействии сфероиды инкубируют во вращающихся сосудах, что поддерживает их в суспендированном состоянии и препятствует прилипанию к стенкам сосуда.
- III. По окончании инкубации промыть сфероиды двумя-тремя сменами среды, не содержащей лекарства, по 5 мин каждой.

I. *Замедление роста объема.* Обработанные лекарственным средством сфероиды можно выращивать в массовой культуре и через различные интервалы времени определять объем отдельных, случайно выбранных сфероидов. Однако для облегчения статистической обработки рекомендуется проводить последовательные измерения на индивидуальных сфероидах, помещенных на слои агара в лунки 24-луночных или 96-луночных пластинок. Более мелкие лунки могут быть использованы для сфероидов диаметром до 600 мкм.

1. В отдельные лунки посейте опытные и контрольные сфероиды из следующего расчета: 24 контрольных сфероидов и по 12—24 сфероидов на каждую концентрацию лекарственного препарата. Для 24-луночной пластинки используйте в качестве подложки 0,5 мл 1%-ного агара и добавляйте сфероиды в 1 мл ростовой среды.

2. С интервалом 2—3 дня измеряйте с помощью окуляр-микрометра в инвертированном микроскопе два перпендикулярных диаметра (X, Y) сфероидов. Размер сфероидов рассчитывайте либо как «средний диаметр» ($\sqrt{XY}$), либо как «объем»:

$$\left[\frac{4}{3} \pi \left(\frac{\sqrt{XY}}{2} \right)^3 \right]$$

Полученные значения используйте для построения кривых роста контрольных и обработанных лекарством сфероидов. Результаты обычно относят к размеру сфероидов до обработки и выражают в форме отношения V_t/V_0 , где V_t — объем сфероида в момент времени t , а V_0 — начальный объем. На рис. 8.7 приведен пример таких построений для сфероидов, полученных из ксенотрансплантата аденокарциномы легких. Метод предполагает симметричность сфероидов. Однако у некоторых клеточных линий наблюдаются расплющивание сфероидов и приобретение ими куполообразной формы, результатом чего является завышение измеряемого объема.

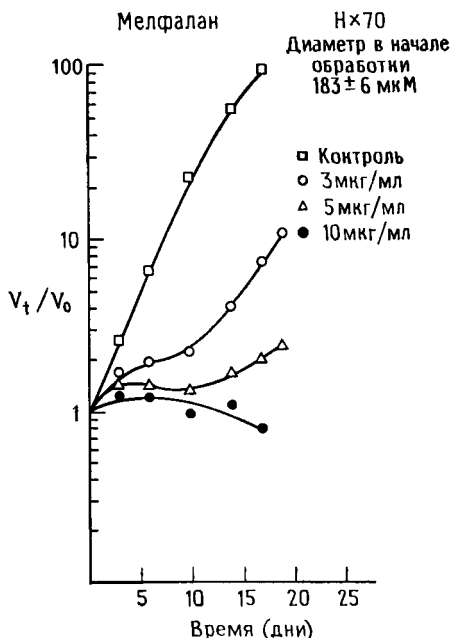


Рис. 8.7. Влияние обработки мелфаланом в течение 1-го ч на рост сфероидов, полученных из аденокарциномы легких. V_0 — объем в начале эксперимента; V_t — объем в момент исследования. Достоверные различия ($p < 0,001$; t — тест Стьюдента) между контролем и всеми концентрациями мелфалана достигаются к 14-му дню культивирования. (Воспроизводится с разрешения издателей [54].)

II. Рост клонов.

1. Обработайте сфероиды 0,25%-ным трипсином или 0,125%-ным трипсином в смеси с 1000 ед./мл коллагеназы типа I (Worthington) градации CLS и получите суспензию одиночных клеток.
2. Доведите концентрацию клеток до 20—200 клеток/мл при использовании клеточных линий или до 10^3 клеток/мл при работе с первичными культурами. При клонировании в суспензии используйте концентрации

10^4 клеток/мл для клеточных линий и $5 \cdot 10^5$ клеток/мл при клонировании первичных культур.

3. Подсчитайте число колоний при достижении ими в контроле заданного размера.

III. *Монослой клеток, выросших из сфероидов*. Получение суспензии одиночных клеток из сфероидов часто оказывается невозможным, и эффективность посева этих клеток может быть очень низкой. Для преодоления этих проблем предлагается следующий метод.

1. Дайте индивидуальным сфероидам прикрепиться ко дну лунок микротитровальных пластинок для культуры ткани.
2. Через 2—3 нед удалите центральный сфероид и определите число клеток в монослое, происходящем из сфероида. Это может быть сделано непосредственно путем подсчета числа клеток после их открепления. С другой стороны, можно использовать методы, приведенные в разд. 9.4.2 и 9.4.3 для количественной оценки действия лекарств на монослой клеток.

9.4. Методы определения цитотоксичности

9.4.1. Определение белка в клеточном монослое

Приведенный протокол основан на методике, предложенной Оямэ и Иглом [30] для культур, помещенных в пробирки.

Реагенты:

Раствор А	карбонат натрия 20 г оксид натрия 4 г натрий, калий тартрат 0,2 г	} растворите в 1 л дистиллированной воды
Раствор Б	сульфат меди 0,5 г дистиллированная вода 100 мл	

Растворы А и Б храните при 4 °С.

Раствор В	50 мл раствора А+1 мл раствора В (готовьте непосредственно перед употреблением)
Раствор Г	1 часть фенольного реагента Фолина 1 часть дистиллированной воды

Для построения стандартной кривой используйте серийные разведения бычьего сывороточного альбумина (10—100 мкг/мл).

- I. Трижды промойте клеточный монослой фосфатным буфером.
- II. Переверните пробирки и дайте стечь жидкости в течение 20 мин.

- III. Внесите в каждую пробирку по 5 мл раствора В и оставьте при комнатной температуре на 20 мин.
- IV. Добавьте по 1 мл дистиллированной воды в каждую пробирку с клетками и в контрольные пробирки и по 1 мл раствора альбумина в пробирки для калибровочной кривой.
- V. Добавьте по 0,5 мл раствора Г в каждую пробирку шприцем для быстрого перемешивания.
- VI. Смешайте содержимое пробирок на мешалке типа Вортекс.
- VII. Через 2 ч определите поглощение на колориметре при 660 мкм. В число измеряемых проб включите контрольные пробирки, содержащие 5 мл раствора В, 1 мл дистиллированной воды и 0,5 мл раствора Г. Некоторые белки ростовой среды сорбируются на поверхности стекла и пластика, что и делает необходимым подготовку контролей в пробирках, содержащих ростовую среду и не содержащих клеток. Стандартная кривая отклоняется от линейности при высоких концентрациях белка, так что при высокой плотности клеток может возникнуть необходимость разбавления. Полученные результаты должны быть с помощью стандартной кривой переведены в концентрации белков; затем определяется процентное содержание белка в пробирках, обработанных лекарствами, по отношению к контрольным пробиркам.

Этот метод может быть применен к пластинкам с определением поглощения в микроюветах в обычном спектрофотометре, а также к 96-луночной пластине с регистрацией поглощения света на одной из доступных установок для просмотра пластинок (Flow, Gibco, Paon).

9.4.2. Определение включения аминокислот в клетки монослоя, растущего в лунках микротитровальных пластинок

Предлагаемый протокол описывает систему определения цитотоксичности лекарств при промежуточной продолжительности их воздействия. В основе лежит метод, впервые разработанный Фрешни с сотрудниками [29]. Условия инкубации и период восстановления могут варьировать в зависимости от задач опыта.

- I. Добавьте по 200 мкл клеточной суспензии в каждую лунку 96-луночной микротитровальной пластинки. Плотность клеток зависит от их типа, скорости пролиферации и продолжительности опыта. Плотность монослоя в контрольных лунках не должна достигать насыщения к концу опыта, так как в этом случае скорость пролиферации снизится по сравнению с таковой в лунках с клетками, обработанными лекарством; кроме того, может произойти открепление контрольных клеток от субстрата. Плотность суспен-

зии при посеве клеток HeLa составляет $2 \cdot 10^4$ клеток/мл; клетки опухолей яичников человека рассеивают более высокой плотностью: $1\text{—}2 \cdot 10^5$ клеток/мл. При длительных опытах из внешних лунок может происходить испарение среды; поэтому внешние лунки следует заполнять средой без клеток. Краевые эффекты, обусловленные испарением, можно ослабить, если использовать пленки для заклеивания пластин (Mylar, Flow Laboratories). Некоторые лекарства могут быть летучими или образовывать летучие метаболиты (например, формамиды высвобождают формальдегид); в связи с этим неспецифическое цитотоксическое действие может проявляться на клетки соседних лунок. При исследовании подобных лекарств такие пленки просто необходимы. Пластинки следует инкубировать во влажной атмосфере воздуха с 5% CO_2 .

- II. После прикрепления клеток и формирования делящегося монослоя (24 ч для клеточных линий, более продолжительное время при работе с первичными и вторичными культурами) смените среду и внесите в лунки соответствующие разведения лекарства. Для каждой концентрации следует использовать не менее трех лунок. Один ряд лунок должен служить контролем, содержащим только ростовую среду.
- III. Инкубируйте клетки с лекарством в течение определенного времени. Если время превышает 24 ч, добавляйте свежие растворы препарата с 24-часовым интервалом. С другой стороны, могут быть использованы более короткие периоды экспозиции, например 1 ч, повторяющиеся в случае необходимости ежедневно.
- IV. По окончании инкубации дважды аккуратно промойте монослой ФСБ. Добавьте в каждую лунку по 200 мкл свежей среды.
- V. Инкубируйте клетки в течение определенного периода восстановления. Если последний превышает 3 сут, меняйте среду каждые 3 дня. Следите за тем, чтобы в контрольных лунках клетки не достигли полного монослоя.
- VI. В конце восстановительного периода в каждую лунку добавьте по 20 мкл раствора ^3H -лейцина (L-4,5- ^3H -лейцин) ($5\text{—}20$ мкКи/мл) на 3 ч.
- VII. Удалите изотоп и трижды промойте монослой ФСБ. Соблюдайте осторожность и не повредите монослой в ходе пипетирования. Для этого лучше всего наклонить чашку под углом 45° и ориентировать пипетку в угол между дном и боковой стенкой лунки.
- VIII. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл фосфатного буфера и 100 мкл метанола, отсосите и добавьте по 100 мкл метанола. Фиксируйте клетки в течение 30 мин. Это предотвращает открепление монослоя в ходе дальнейшей работы.

- IX. Слейте метанол и высушите чашки током воздуха. Сухие чашки до начала последующих операций должны храниться при 4°C в течение не менее чем 48 ч.
- X. Поместите чашки на лед и промойте монослой ледяной 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) (3 раза по 5 мин). При этом чашки можно просто переворачивать и 1—2 раза встряхивать.
- XI. Отмойте монослой от ТХУ метанолом, высушите током воздуха и добавьте в каждую лунку по 100 мкл 1 н NaOH. Оставьте на ночь при комнатной температуре для солиubilизации белков.
- XII. Перенесите 100 мкл NaOH из каждой лунки в мини-флаконы, помещенные в стеклянные сцинтилляционные флаконы.
- XIII. Добавьте в каждый флакон по 2,4 мл сцинтилляционной жидкости (например, Fisofluor, Fisons Ltd.) и затем по 100 мкл 1,1 н HCl для подкисления содержимого.
- XIV. Закройте флаконы, перемешайте содержимое до гомогенности и просветления и просчитайте 5—10 мин в счетчике для β -излучателей.
- XV. Полученные результаты выразите в процентах от числа импульсов в контроле.

Некоторые клетки из биопсийного материала опухолей человека оказываются слабо адгезивными, но могут размножаться в суспензии. Предложенная методика полностью применима к таким клеткам при условии, что чашки будут отцентрифугированы при 1000 об/мин в течение 15 мин до удаления среды.

9.4.3. Измерение включения аминокислот в белки с помощью флюорографии

Описанная выше методика, использующая жидкостный сцинтилляционный счетчик, оказывается трудоемкой и может быть источником проблем при работе с большим числом пластинок, особенно при недостатке оборудования для β -сцинтилляционного счета. Мини-флаконы могут терять сцинтилляционную жидкость через стенки после нескольких дней хранения, хотя такие потери снижаются в случае хранения препаратов перед счетом при 4°C . Во всяком случае, образцы должны быть просчитаны как можно скорее. Альтернативный метод, вполне пригодный для автоматизации, был предложен Фрешни с сотрудниками [43].

- I. Проведите все манипуляции согласно протоколу разд. 9.4.2 (I)—(X), используя ^{35}S -метионин (42 Ки/моль) в концент-

рации 5 мкКи/мл для мечения клеток на этапе (IV). Может быть использован и ^3H -лейцин, но в таком случае требуется более длительная экспозиция с рентгеновской пленкой.

- II. Добавьте в каждую лунку по 50 мкм сцинтилляционной жидкости, приготовленной на основе толуола, и центрифугируйте открытые чашки в держателе микротитровальных пластинок при 800 об/мин в течение 1 ч при комнатной температуре. Этот метод обеспечивает равномерное испарение сцинтилляционной жидкости, в результате чего на дне лунок создается плоский слой сцинтиллятора, улучшающий разрешение. Толуольный сцинтиллятор может быть заменен салицилатом натрия, что позволяет избежать растворения материала пластинок и образования при испарении токсичных паров толуола.
- III. Перенесите пластинки в темную комнату и установите их на листы рентгеновской пленки. Установите прижимную плиту из металла или стекла с прокладкой из полиуретановой губки и зафиксируйте липкой лентой или специальными зажимами. Установите пластинки в темный ящик с влагопоглотителем. Пять дней экспонирования обеспечат поглощение 0,92 при плотности клеток 3000 на лунку после инкубации с ^{35}S -метионином (84 Ки/моль) в концентрации 10 мкКи/мл.
- IV. Проявите пленку 5 мин в проявителе Кодак D19 при 20 °C. Фиксируйте раствором Илфофикс в течение 4 мин, промойте 2 мин в осветляющем растворе Гипо и затем 5 мин в проточной водопроводной воде. Высушите пленку.
- V. Для количественной оценки результатов просканируйте изображение в микроденситометре (например, Хромоскан Joyce Loebel, Gateshead, UK) с тонкослойной приставкой, используя кольцевую апертуру 11 мм и синий фильтр (465 нм). Значения ID_{50} могут быть получены непосредственно по результатам определения оптической плотности.

9.4.4. Включение ^3H -нуклеотидов в ДНК и РНК

Следующая процедура описывает систему определения цитотоксичности лекарственных препаратов, занимающую 3 ч.

- I. Концентрация клеток в суспензии должна в 10 раз превышать конечную концентрацию живых клеток (обычно 10^5 — $5 \cdot 10^5$ клеток/мл).
- II. Добавьте разведения растворов лекарств (по 900 мкл на пробирку), используя по три параллели на каждую концентрацию лекарства, включая соответствующие контроли. Добавьте в каждую пробирку по 100 мкл клеточной суспензии.

- III. Инкубируйте пробы при 37 °C в течение 2 ч (см. разд. 9.2) и в конце второго часа добавьте изотоп (2,5 мкКи/мл). Можно использовать 6-³H-уридин (22 Ки/ммоль), метил-³H-тимидин (5 Ки/ммоль) или 6-³H-дезоксимуридин (25 Ки/ммоль). Инкубируйте в течение 1 ч.
- IV. Клетки отцентрифугируйте и 3 раза промойте ФСБ для удаления лекарств и изотопа. Важно тщательно промывать клетки, чтобы удалить не включенную радиоактивность.

Дальнейшая подготовка препаратов определяется наличием того или иного оборудования. Наиболее простой и надежный метод заключается в фильтрации клеток на фильтрах из стеклянных волокон под вакуумом, экстракции клеток ТХУ, промывке и высушивании. Для выполнения этих операций выпускается целый ряд приспособлений, включая приспособление для фильтрования, устанавливаемую на колбу Бюхнера (Millipore UK, Ltd.) головку для одновременного фильтрования многих проб (Millipore UK, Ltd.) и многочисленные устройства для автоматического сбора образцов с микротитровальных пластинок, снабженные адапторами для пробирок (Flow Laboratories, Dynatek, Naccon). Приспособления для фильтрования одного образца непригодны в случае обработки многих препаратов из-за значительного времени, расходуемого на каждый образец. Основная процедура заключается в следующем.

- I. Соберите клетки на фильтровальную бумагу из стекловолокна, используя 2—3 смыва культурального сосуда для полного сбора клеток.
- II. Промойте фильтры 5 мл ледяной 10%-ной ТХУ 3 раза.
- III. Для удаления воды промойте фильтры последовательно метанолом, смесью метанола с эфиром и эфиром.
- IV. Высушите фильтры и перенесите их в сцинтилляционные флаконы с 10 мл эмульсифицирующей сцинтилляционной смеси (например, Beckman Ready Sol HP [High Performance]).
- V. Перед счетом выдержите флаконы в темноте в течение, по крайней мере 1 ч для гашения хемилюминесценции, завышающей счет.
- VI. Просчитайте образцы в течение 5—10 мин или более длительного времени, обеспечивающего среднеквадратичную ошибку счета ниже $\pm 5\%$.

В прекрасном обзоре [55] подробно описаны проблемы, связанные с использованием систем гетерогенного сцинтилляционного счета, аналогичных описанной выше.

Если в распоряжении исследователя нет устройств для фильтрования, то обработку препаратов следует проводить в стеклянных культуральных сосудах.

- I. Осадите промытые клетки центрифугированием.
- II. Добавьте 1 мл ледяной 10%-ной ТХУ, ресуспендируйте клетки и дайте им осесть в ледяной бане в течение 5 мин, вновь отцентрифугируйте и дважды повторите экстракцию ТХУ.
- III. Промойте осадок метанолом, смесью метанол — эфир и высушите.
- IV. Добавьте к осадку 1 мл сцинтилляционной жидкости и после растворения перенесите в сцинтилляционный флакон. Доведите объем до 10 мл и просчитайте, как было указано выше.
- I. *Модификации.* Следующая процедура предложена для определения включения ^3H -тимидина в ДНК клеток, растущих в суспензии над мягким агаром [37].
 - I. Добавьте к клеткам 25 мкл [метил- ^3H]-тимидина (6,7 Ки/ммоль, разведенного ФСБ до 75 мКи/мл) на 24 ч.
 - II. Соберите клетки и промойте их фосфатным буфером.
 - III. Добавьте к промытым клеткам 5%-ную ТХУ при 4°C и оставьте на 30 мин.
 - IV. Центрифугируйте и повторите этап (III) в течение 10 мин.
 - V. Промойте метанолом.
 - VI. Ресуспендируйте осадок в 0,5 мл десятикратного гиамин-гидроксида и прогрейте 1 ч при 60°C .
 - VII. Перенесите в 12 мл сцинтилляционной жидкости и просчитайте.

9.4.5. Общий синтез ДНК, определяемый по включению ^{125}I -ИУДР

В основе метода лежит публикация [39].

- I. Добавьте ^{125}I -ИУДР в среду монослойной культуры до концентрации 0,06 мКи/мл и инкубируйте 24 ч.
- II. Трижды промойте культуры солевым раствором и добавьте свежую среду.
- III. Через 6 ч повторите промывку для удаления невключившейся метки и метки, высвобождающейся из лизированных мертвых клеток. Подсчет связанной с клетками радиоактивности проводите в γ -счетчике.

Как и в случае испытаний на микротитровальных пластинках не следует допускать образования полного монослоя в контрольных пробах. Избыточная плотность ведет к снижению включения ^{125}I -ИУДР, а это будет отражаться на оценке гибели клеток. Когда клетки выращиваются в виде монослоя в наклонных пробирках, максимальное количество клеток составляет около $2 \cdot 10^5$, минимальное — $2 \cdot 10^4$ клеток.

10. Интерпретация результатов

10.1. Взаимосвязь между количеством клеток и индексом цитотоксичности

Объективность индекса цитотоксичности зависит от линейной зависимости между числом клеток и исследуемым признаком цитотоксичности; наличие линейности следует устанавливать во всех тестах на цитотоксичность. В исследованиях на клонообразование линейность может нарушаться: при низкой плотности эффективность клонирования повышается благодаря наличию в среде кондиционирующих факторов; при высокой плотности — понижается из-за истощения питательных веществ. В опытах по определению цитотоксичности отклонения от линейности при высокой плотности клеток могут быть обусловлены зависящим от плотности подавлением соответствующего метаболического процесса; при малом числе клеток причиной отклонения от линейности может быть предел чувствительности опыта. Это приводит иногда к появлению кажущейся стимуляции при низкой концентрации лекарств и к завышению оценки гибели клеток при высокой концентрации лекарств. Следовательно, число клеток в контроле к концу испытания должно попадать на линейный участок кривой. При высоком уровне гибели клеток точность измерения зависит от диапазона, в котором эта линейность сохраняется; от точности измерения зависит также и количество погибших клеток. Если результаты отложены в логарифмической шкале, это означает, что опыт обеспечивает точные результаты при гибели 3—4 порядков клеток. Это следует подтвердить, прежде чем прибегать к такому способу выражения результатов. Особое значение это имеет при исследовании действия комбинаций лекарств *in vitro*, когда синергизм или аддитивность часто проявляются после снижения количества клеток на два порядка.

10.2. Кривые зависимости полученных результатов от концентрации

В опытах по определению цитотоксичности результаты обычно представляются в форме кривых зависимости эффекта от концентрации. При изучении подавления какого-либо процесса для регистрации полученных результатов необходима линейная шкала; в опытах по определению эффективности клонирования обычно пользуются логарифмической шкалой. Ошибки опыта для параллельных точек выражают как среднее значение $\pm$ среднеквадратичное отклонение; для получения каждой такой точки необходимо, следовательно, не менее трех параллельных результатов. Некоторые средние значения могут потре-

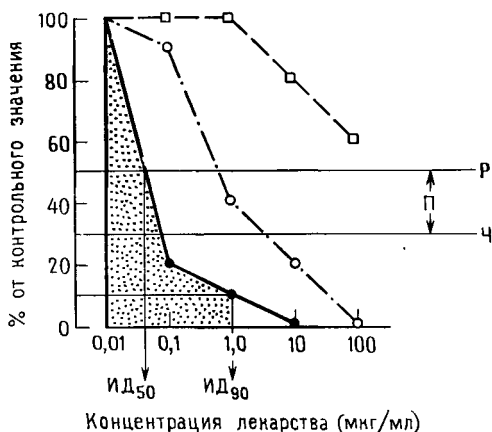


Рис. 8.8. Интерпретация результатов с использованием линейного графика зависимости ответа от концентрации лекарства. ИД₅₀ и ИД₉₀ — концентрации, требующиеся для снижения жизнеспособности клеток до 50 и 90% от контрольного значения соответственно. Точками выделена площадь под кривой между 0 и 1 мкг/мл (для максимальной концентрации в плазме 10 мкг/мл). Ч — граница чувствительности. Р — граница резистентности. П — промежуточная зона. ●—● — чувствительная популяция; ○—○ — промежуточная популяция; ■—■ — резистентная популяция.

боваться для определения чувствительности популяции клеток сравнительно с другими клеточными популяциями или для различных условий опыта. На рис. 8.8 представлены способы получения некоторых параметров.

10.2.1. Площадь под кривой (ППК)

Использование ППК отражает идею о том, что форма кривой зависимости эффекта от концентрации может быть более показательной при назначении химиотерапии, чем количество клеток, погибших при какой-либо одной концентрации лекарства. Величина ППК вычисляется методом трапеций, при котором суммируются площади прямоугольников и треугольников под кривой выживания. Наиболее широкое применение этот метод нашел в программе «Испытания стволовых клеток опухолей человека» [56].

10.2.2. Точки отсечения для определения чувствительности и резистентности

Кривые зависимости эффекта от концентрации лекарств, построенные для разных опухолей, могут показывать, что опухоли чувствительны к исследуемому лекарству в различных диапа-

зонах концентраций (иначе говоря, перекрывание кривых оказывается минимальным). В этом случае информация об относительной чувствительности различных опухолей может быть получена путем определения чувствительности при одной концентрации (точка отсечения), и этот метод является наиболее широко распространенным в прогностических испытаниях *in vitro*. При ретроспективных поисках корреляций между данными *in vitro* для определения этих точек отсечения обнаруживается промежуточная зона, не позволяющая определять попавшие в нее опухоли ни как чувствительные, ни как резистентные. Для опухолей этой зоны отсутствуют также четкие корреляции между результатами *in vitro* и клиническими ответами. Размер промежуточной зоны, по крайней мере частично, определяется точностью опыта, так что более обширные промежуточные зоны обычно соответствуют результатам с более высоким среднеквадратичным отклонением. Хотя чувствительность может быть определена при одной концентрации, но рекомендуется, особенно на начальных стадиях испытаний, использовать несколько концентраций лекарственного препарата.

10.2.3. Значения ID_{50} и ID_{90}

Чувствительность опухолей может быть также определена значениями ID_{50} и ID_{90} (то есть концентрациями лекарственных препаратов, подавляющих жизнеспособность клеток на 50 и 90 % соответственно).

10.2.4. Корреляция между результатами *in vitro* и *in vivo*

Критерии для отнесения опухолей к чувствительным или резистентным основаны на корреляциях между результатами *in vitro* и клиническими ответами, использующими «предварительный набор» данных. В лаборатории, использующей определенный метод оценки чувствительности опухолей, можно получить «свой лабораторный» набор предварительных данных, позволяющих выявить межлабораторные вариации. Ответ на химиотерапию больных с опухолями промежуточной чувствительности может зависеть от различных прогностических факторов, не связанных непосредственно с чувствительностью опухоли, например степени тяжести заболевания к началу химиотерапии, стадии опухолевого процесса, гистологии опухоли, времени удвоения опухолевых клеток, наличия предшествующей химиотерапии и ее эффективности. Попытки расположить больных в соответствии с этими параметрами могут помочь в получении более достоверной информации при анализе результатов *in vitro*. Количественная оценка ответа опухоли также может иметь большое значение. Следует подчеркнуть, что обнаружение

чувствительности к химиотерапевтическим препаратам *in vitro* можно рассматривать лишь как предположение о том, что под действием данных веществ погибнет некоторая часть клеток *in vivo*. Прогнозировать полную ремиссию на основании таких данных нельзя, поскольку не учитывается множество других факторов. Истинная оценка положительной корреляции в опытах определяется как

$$\frac{S/S + S/R}{S/S} \cdot 100 \% \quad (12)$$

где числитель в каждой дроби выражает ответ *in vitro*, а знаменатель — ответ *in vivo*. Истинная оценка отрицательной корреляции выражается как

$$\frac{R/R + R/S}{R/R} \cdot 100 \% \quad (13)$$

При оценке достоверности степеней корреляции их следует сравнивать с оценками корреляций, полученными на случайно выбранных результатах *in vitro* [57]. Например, препарат характеризуется 50%-ным ответом *in vivo*, и 50% опухолей чувствительны к нему *in vitro*. Если результаты *in vitro* равномерно распределены между чувствительностью и резистентностью, то вероятность получения положительной корреляции между чувствительностью *in vitro* и ответами *in vivo* будет составлять 50% от 50%, то есть 25%. Такой же будет положительная корреляция между резистентностью *in vivo* и резистентностью *in vitro*. Общая кажущаяся положительная корреляция будет, следовательно, составлять 50%. Поиски корреляций *in vivo* и *in vitro* затруднены также использованием режимов комбинированной терапии при лечении больных. Строго говоря, поиски корреляции возможны, только когда имеются данные *in vitro* по всем лекарствам. Будут ли они испытываться в комбинации, зависит от схемы лечения, поскольку многие лекарства вводятся последовательно. Точно так же если используемая система позволяет регистрировать гибель клеток в пределах двух порядков, то она может оказаться недостаточно чувствительной для выявления синергичного или аддитивного эффектов.

11. Трудности метода и их преодоление

К числу проблем, возникающих при проведении подобных исследований, относятся:

- I. большое среднеквадратичное отклонение;
- II. вариабельность различных систем исследований, проведенных на одной и той же клеточной популяции;
- III. стимуляция выше контрольного уровня.

11.1. Большое среднеквадратичное отклонение

К числу возможных причин большого среднеквадратичного отклонения относятся:

- I. ошибки в равномерности отбора клеточной суспензии, обусловленные, как правило, неаккуратным перемешиванием исходной суспензии в период отбора образцов. Это приводит к неравномерному распределению клеток между параллелями;
- II. присутствие крупных клеточных агрегатов в исходной суспензии, приводящее к неравномерному распределению клеток между параллелями;
- III. неспецифичность конечного результата при исследовании цитотоксичности (например, измерение несвязавшейся радиоактивности) (см. разд. 9.4.4).

11.2. Различия между опытами

При работе с биопсийным материалом опухолей человека нельзя, естественно, повторить опыт через несколько дней, чтобы проверить воспроизводимость результатов. Такая задача, однако, может быть решена при использовании клеточных линий. Сейчас уже твердо установлено, что линии клеток, обладающие определенным уровнем чувствительности, вдруг по невыясненным причинам дают «неодинаковые» ответы. К числу причин, приводящих к таким результатам относятся:

- I. невозможность получать популяции клеток в идентичной фазе роста культуры (фаза экспоненциального роста, или ранняя стационарная фаза, или поздняя стационарная фаза);
- II. порча исходных растворов лекарственных препаратов (см. разд. 5);
- III. раствор лекарства с коротким временем полужизни следует использовать немедленно после разведения; это обеспечивает постоянство действия его на клетки в каждом опыте;
- IV. неспособность стандартизовать условия инкубации (см. разд. 9.2).

Система определения цитотоксичности должна воспроизводиться на клетках в культуре, прежде чем она будет применена к биопсийному материалу человека.

11.3. Стимуляция выше контрольного уровня

Стимуляция может быть истинной мерой клеточных событий, а может быть связана с техническими артефактами. К числу таких артефактов относятся:

- I. неспецифическое связывание радиоактивности;
- II. подавление метаболических реакций в контроле, зависящее от плотности монослоя и не проявляющееся в экспериментальных культурах, в которых часть клеток гибнет;
- III. стимуляция включения клетками метаболического пред-

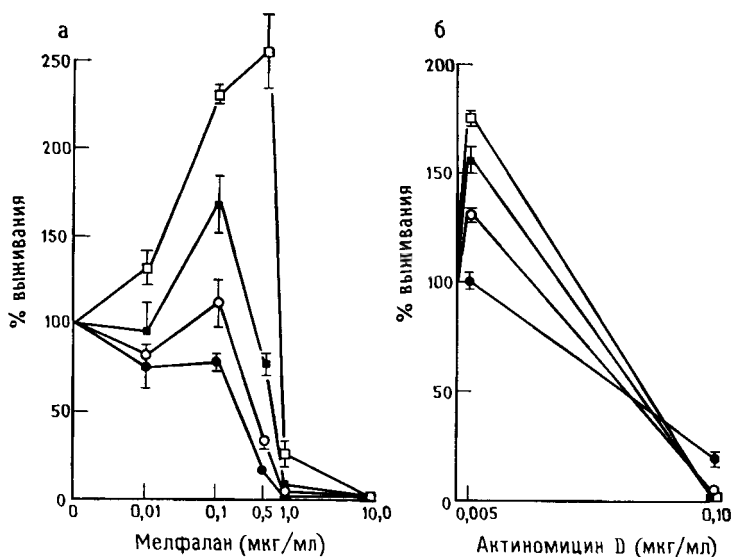


Рис. 8.9. Влияние размера колоний на кривые выживания клеток мышинной меланомы (линия CCL) в присутствии мелфалана (а) и биопсий меланомы человека в присутствии актиномицина D (б). Размер растущих колоний и их количество измеряли с помощью автоматизированной системы анализа изображения FASII. ● ≥ 60 мкм; ○ ≥ 104 мкм; ■ ≥ 124 мкм; □ ≥ 149 мкм. Показаны средние значения $\pm$ среднеквадратичная ошибка. (Воспроизводится с разрешения издателей [58].)

шественника антиметаболитами (например, стимуляция включения тимидина 5-фторурацилом и метотрексатом).

Результаты недавних исследований по определению эффективности клонирования показали [58], что плотность клеток при посеве влияет на размеры растущих колоний. При увеличении плотности посева число крупных колоний снижается. Проверили влияние этого эффекта на уровни чувствительности к лекарствам и показали, что, как и ожидалось, кривая зависимости опыта от концентрации сильно зависела от критерия размеров, выбираемого для регистрации колоний. При регистрации крупных колоний обнаружили стимуляцию выше контрольного уровня (рис. 8.9).

11.4. Сравнение цитотоксичности и противоопухолевой активности

При использовании результатов *in vitro* в качестве предварительного скрининга в поисках противоопухолевой активности следует делать различие между неспецифической цитотоксичностью и специфической противоопухолевой активностью. Следует помнить, что результаты опытов *in vitro* не могут служить критерием терапевтической эффективности лекарств. В табл. 8.5

Таблица 8.5. Предлагаемые критерии для дифференциации неспецифической цитотоксичности и противоопухолевой активности

Цитотоксичность	Противоопухолевая активность
Проявляется в равной степени в популяциях делящихся и неделящихся клеток	Более эффективна в популяциях делящихся клеток
В разных популяциях опухолевых клеток ответы сходны	Гетерогенность ответов между разными популяциями опухолевых клеток
Отсутствие различий в ответах нормальных и опухолевых клеток	Опухолевые клетки более чувствительны, чем нормальные
Первичные биохимические повреждения связаны с нарушением энергетического метаболизма клеток или генерацией свободных радикалов	Первичные биохимические повреждения: (I) подавление репликации ДНК или транскрипции РНК, если препарат связывается с ДНК; (II) подавление биосинтеза нуклеотидов

представлены главные критерии, которыми следует пользоваться для разделения этих двух эффектов лекарств, хотя существуют и исключения из этих правил.

12. Автоматизация

Автоматизация является совершенно необходимым условием широкого скрининга лекарств и опухолей. Однако ни одно из описанных выше исследований, за исключением, может быть, тех, которые подразумевают использование микротитровальных пластинок, недоступно для автоматизации. Получение количественных характеристик с помощью автоматических приборов в наибольшей степени реально для исследований с использованием радиоактивных изотопов, хотя это может потребовать высокого уровня технической оснащенности; эти требования значительно снижаются при использовании флюорографического метода, приведенного в разд. 9.4.3. Для автоматизированного подсчета колоний пригодны также различные устройства с распознаванием образов. Предложенный недавно метод регистрации электрического сопротивления клеточных культур обеспечивает щадящее

определение цитотоксичности в разных временных точках; исследование может быть полностью автоматизировано. Эта техника была успешно использована для измерения чувствительности к лекарствам различных клеточных популяций [59].

13. Дальнейшие перспективы

Исследование цитотоксичности *in vitro* представляет собой относительно новую область оценки безопасности лекарств. Существует несколько аспектов развития исследований, направленных на дальнейшее выяснение роли этих работ. В их числе:

- I. развитие определенных систем биоактивации для метаболического превращения в цитотоксические метаболиты;
- II. исследование препаратов с известной цитотоксической активностью для сравнения эффектов *in vitro*;
- III. развитие культуральных систем для роста нормальных клеток-мишеней;
- IV. разработка систем исследования *in vitro* соединений с различными механизмами действия и сравнение различных методов испытаний;
- V. идентификация механизмов цитотоксичности.

Увеличение количества публикаций, посвященных роли исследований цитотоксичности *in vitro* в химиотерапии рака, вызывает оптимизм. Количество этих публикаций особенно резко увеличилось в связи с недавним развитием методов клонирования биопсийного материала человека. В 1983 г. была проведена международная конференция, глубоко осветившая современную ситуацию, касающуюся прогностических испытаний *in vitro* [60]. В настоящее время не вызывает сомнений точность предсказаний, основанная на ретроспективном материале; истинная ценность таких предсказаний станет ясной только после опубликования результатов прогностических исследований, в которых будет проведено сравнение эффективности лечения предварительно нелеченных больных, которым назначалось лечение на основании клинических и лабораторных исследований. Такие исследования требуют большого количества больных и могут быть проведены на базе нескольких онкологических центров. Дальнейшего развития требуют и следующие аспекты:

- I. идентификация специфических ростовых факторов для эффективного роста клеток и тканей *in vitro*;
- II. выведение большого числа линий клеток от опухолей различного типа;
- III. скрининг новых противоопухолевых лекарств и потенциально активных лекарств (в том числе агентов второго поколения) против линий клеток, происходящих из опухолей человека;
- IV. использование систем определения цитотоксичности *in vitro* для создания комбинаций лекарств, оценки дозовых зави-

- симостей и разработки методов оптимального введения лекарств;
- V. выделение линий резистентных клеток от пациентов, получавших химиотерапевтические препараты, для изучения механизмов развития резистентности;
- VI. клонирование клеток, полученных от пациентов, не получавших лекарств, для обнаружения неодинаковой чувствительности к лекарствам и механизмов первичной резистентности.

Литература

1. Gellhorn A., Hirschberg E. (1955). *Cancer Res.*, **15**, Suppl. 3, 1.
2. Foley G. E., Epstein S. S. (1964). *Adv. Chemother.*, **1**, 175.
3. Hakala M. T., Rustrum Y. M. (1979). In: *Methods in Cancer Research. Cancer Drug Development*. Part A, DeVita V. T., Busch H. (eds.), Academic Press, p. 247.
4. Dendy P. P., ed. (1976). *Human Tumours in Short-term Culture. Techniques and Clinical Application*, published by Academic Press.
5. Dendy P. P., Hill B. T., eds. (1983). *Human Tumour Drug Sensitivity Testing in Vitro. Techniques and Clinical Applications*, published by Academic Press.
6. Turner P., ed. (1983). *Animals in Scientific Research. An Effective Substitute for Man?*, published by MacMillan Press, Ltd.
7. Eagle H., Foley G. E. (1956). *Am. J. Med.*, **21**, 739.
8. Wright J. C., Cobb J. P., Gumpert S. L., Golomb F. M., Safadi D. (1957). *New Engl. J. Med.*, **257**, 1207.
9. Wilson A. P., Neal F. E. (1981). *Br. J. Cancer*, **44**, 189.
10. Silvestrini R., Sanfilippo O., Daidone M. G. (1983). In: *Human Tumour Drug Sensitivity Testing in Vitro*, Dendy P. P., Hill B. T. (eds.), Academic Press, p. 281.
11. Salmon S. E. (1980). In: *Cloning of Human Tumour Stem Cells. Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 48, Salmon S. E. (ed.), Alan R. Liss Inc., NY, p. 281.
12. Masters J. R. W. (1983). In: *Human Tumour Drug Sensitivity Testing in Vitro*, Dendy P. P., Hill B. T. (eds.), Academic Press, p. 163.
13. Volm M., Wayss K., Kaufmann M., Mattern J. (1979). *Eur. J. Cancer*, **15**, 983.
14. KSST. Group for Sensitivity Testing of Tumours, *Cancer*, **48**, 2127.
15. Durkin W. J., Ghanta V. K., Balch C. M., Davis D. W., Hiramoto R. N. (1979). *Cancer Res.*, **39**, 402.
16. Raich P. C. (1978). *Lancet*, **i**, 74.
17. Weisenthal L. M., Marsden J. (1981). *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **22**, 155.
18. Morgan D., Freshney R. I., Darling J. L., Thomas D. G. T., Celik F. (1983). *Br. J. Cancer*, **47**, 205.
19. Hill B. T. (1983). In: *Human Tumour Drug Sensitivity Testing in vitro*, Dendy P. P., Hill B. T. (eds.), Academic Press, p. 91.
20. Agrez M. W., Kovach J. S., Lieber M. M. (1982). *Br. J. Cancer*, **46**, 88.
21. Bertoncello I. et al. (1982). *Br. J. Cancer*, **45**, 803.
22. Rupniak H. T., Hill B. T. (1980). *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**, 479.
23. Hamburger A. W., Salmon S. E., Kim M. B., Trent J. M., Soehnlen B., Alberts D. S., Schmidt H. J. (1978). *Cancer Res.*, **38**, 3438.
24. Salmon S. E., ed. (1980). *Cloning of Human Tumour Stem Cells. Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 48, published by Alan R. Liss Inc., NY.
25. Courtenay V. D., Mills J. (1978). *Br. J. Cancer*, **37**, 261.

26. Tveit K. M., Endresen L., Rugstad H. E., Fodstad Q., Pihl A. (1981). *Br. J. Cancer*, **44**, 539.
27. Alberts D. S., George Chen H.-S., Salmon S. E. (1980). In: *Cloning of Human Tumour Stem Cells*, Salmon S. E. (ed.), Alan R. Liss, Inc., NY, p. 197.
28. Alberts D. S., George Chen H.-S. (1980). In: *Cloning of Human Tumour Stem Cells*, Salmon S. E. (ed.), Alan R. Liss, Inc., NY, Appendix 4.
29. Freshney R. I., Paul J., Kane I. M. (1975). *Br. J. Cancer*, **31**, 89.
30. Oyama V. I., Eagle H. (1956). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**, 305.
31. Bickis I. J., Henderson I. W. D., Quastel J. H. (1966). *Cancer*, **19**, 103.
32. Dickson J. A., Suzanger M. (1976). In: *Human Tumours in Short Term Cultures. Techniques and Clinical Applications*, Dendy P. P. (ed.), Academic Press, p. 107.
33. Buskirk H. H., Crim J. A., Van Giessen G. J., Petering H. G. (1973). *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 135.
34. Roper P. R., Drewinko B. (1976). *Cancer Res.*, **36**, 2182.
35. Weisenthal L. M., Dill P. L., Kurnick N. B., Lippman M. E. (1983). *Cancer Res.*, **43**, 258.
36. Grunicke H., Hirsch F., Wolf H., Bauer V., Kiefer G. (1975). *Exp. Cell. Res.*, **90**, 357.
37. Friedman H. M., Glaubiger D. L. (1983). *Cancer Res.*, **42**, 4683.
38. Sondak V. K. et al. (1984). *Cancer Res.*, **44**, 1725.
39. Dendy P. P., Dawson M. P. A., Warner D. M. A., Honess D. J. (1976). In: *Human Tumours in Short Term Culture. Techniques and Clinical Applications*, Dandy P. P. (ed.), Academic Press, p. 139.
40. Forbes I. J. (1963). *Aust. J. Exp. Biol.*, **41**, 255.
41. Izsak F. Ch., Gottlieb-Stematsky T., Eylar E., Gazith A. (1968). *Eur. J. Cancer*, **4**, 375.
42. Edwards A. J., Rowlands G. F. (1968). *Br. J. Surg.*, **55**, 687.
43. Freshney R. I., Morgan D. (1978). *Cell Biol. Int. Rep.*, **2**, 375.
44. Freshney R. I., Celik F., Morgan D. (1983). In: *Control of Tumour Growth and its Biological Base*, Davis W., Maltoni C., Tanneberger St. (eds.).
45. Wilson A. P., Ford C. H. J., Newman C. H., Howell A. (1984). *Br. J. Cancer*, **49**, 57.
46. Bosanquet A. G. (1984). *Br. J. Cancer*, **49**, 385.
47. Powers J. F., Sladek N. E. (1983). *Cancer Res.*, **43**, 1101.
48. Fry J. R. (1983). In: *Animals in Scientific Research. An Effective Substitute for Man?*, Turner P. (ed.), Macmillan Press Ltd., p. 81.
49. Davies D. S., Boobis A. R. (1983). In: *Animals in Scientific Research. An Effective Substitute for Man?*, Turner P. (ed.), Macmillan Press Ltd., p. 69.
50. Barranco S. C., Bolton W. E., Novak J. K. (1980). *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 913.
51. Courtenay V. D., Mills J. (1981). *Br. J. Cancer*, **44**, 306.
52. Gupta V., Krishan A. (1982). *Cancer Res.*, **42**, 1005.
53. Nederman T., Twentyman P. (1984). In: *Culture of Cellular Spheroids. A Handbook for Culture Techniques and Tumour Biological Tests. Chapter 5. Recent Results in Cancer Research*, Acker H., Carlsson J., Durand R., Sutherland S. M. (eds.), in press.
54. Jones A. C., Stratford I., Wilson P. A., Peckham M. J. (1982). *Br. J. Cancer*, **46**, 870.
55. Kolb A. I. (1981). *Lab. Equipment Digest*, **19**, 87.
56. Moon T. E. (1980). In: *Cloning of Human Tumour Stem Cells*, Salmon S. E. (ed.), Alan R. Liss, Inc, NY, p. 209.
57. Berenbaum M. C. (1974). *Lancet*, **ii**, 1141.
58. Meyskens F. L., Jr., Thomson S. P., Hickie R. A., Sipes N. J. (1983). *Br. J. Cancer*, **48**, 863.
59. Khan W. H., Ommaya A. K. (1981). Abstract for 3rd International Symposium on Rapid Methods and Automation in Microbiology.
60. International Conference Predictive Drug Testing on Human Tumour Cells, Zurich, 20—22 July 1983.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ РАДИОАВТОГРАФИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ КЛЕТОЧНЫХ РНК, ГИБРИДИЗИРОВАННЫХ *IN SITU* С МЕЧЕННЫМИ ТРИТИЕМ ЗОНДАМИ

Д. Конки

1. Введение

1.1. Принцип

Метод молекулярной гибридизации, предложенный Джиллеспии и Спигельманом [1], включает в себя связывание одонитевой нуклеиновой кислоты из раствора с комплементарным участком нуклеиновой кислоты, иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре. В аналогичных экспериментах двунитевая гибридная молекула образуется благодаря связыванию экзогенной одонитевой высокорadioактивной нуклеиновой кислоты с комплементарным участком нуклеиновой кислоты, фиксированной в цитологических препаратах хромосом (так называемая гибридизация *in situ*) [2, 3]. Используя для гибридизации фиксированные препараты клеток, этот метод был модифицирован для выявления транскриптов цитоплазматических РНК внутри индивидуальных клеток [4, 5].

1.2. Преимущества гибридизации *in situ*

Обычная техника гибридизации *in vitro* обеспечивает получение усредненных показателей для ткани-мишени в целом. Это затрудняет интерпретацию результатов, полученных на смешанной популяции клеток разных типов, или на популяции клеток одного типа, неоднородных, например, по стадии дифференцировки, или по положению в клеточном цикле при асинхронной пролиферации, или по другим показателям. Техника гибридизации *in situ* позволяет в известном смысле преодолеть эти проблемы, поскольку полученные результаты относятся к индивидуальной клетке и даже к индивидуальной хромосоме. Комбинация гибридизации с цитологическим исследованием позволяет получить дополнительную информацию о локализации молекулярного гибрида в той или иной структуре ткани-мишени. И наконец, этот метод пригоден для анализа небольшого числа клеток.

2. Основные требования

Эффективность гибридизации *in situ* зависит от следующих параметров: (I) частоты встречаемости нуклеотидных последовательностей-мишеней (т. е. числа специфических последовательностей нуклеиновой кислоты, присутствующих в цитологическом препарате); (II) чистоты зонда; (III) удельной радиоактивности меченого зонда; (IV) чувствительности метода гибридизации; (V) усиления сигнала; (VI) эффективности метода радиоавтографического выявления пробы.

2.1. Избыточность последовательности

Первоначально метод гибридизации *in situ* был наиболее успешно применен для выявления нуклеиновых кислот, находящихся в клетках в большом количестве копий. Этим методом выявляли, например, повторяющиеся последовательности сателлитных ДНК, амплифицированные рибосомальные ДНК в ооцитах амфибий, латерально амплифицированные ДНК в полигенных хромосомах двукрылых, рибосомальную и 5S РНК. Более того, с помощью этой же техники были идентифицированы и локализованы накапливающиеся в клетках транскрипты генов.

В то же время, последовательности генов, присутствующие в клетках млекопитающих в виде одной копии, были достоверно локализованы в определенных участках генома только недавно. Этого удалось достигнуть благодаря использованию зондов с высокой удельной активностью и развитию методов усиления сигнала.

2.2. Чистота зондов

Результаты молекулярной гибридизации *in situ* могут быть достоверными только при условии высокой чистоты зондов; поскольку метод основан на использовании избытка зонда, даже малейшие примеси могут принимать участие в гибридизации. Используя стандартные физические методы, можно получить зонды высокой чистоты для нуклеиновых кислот, имеющих в избытке, таких как рибосомальная РНК. Однако относительно низкая концентрация большинства видов мРНК создает значительные трудности при использовании этих методов для получения зондов в чистом виде и в достаточном количестве. Проблема примесных последовательностей нуклеиновых кислот решается благодаря применению методов клонирования рекомбинантных ДНК; в принципе эти методы могут быть использованы для получения зондов на любые интересующие вас гены или участки генома.

2.3. Удельная активность зондов

Удельная радиоактивность зондов должна быть достаточно высокой, чтобы обеспечить их выявление после гибридизации при разумном времени экспозиции радиоавтографов и при высоком отношении сигнал/шум. Экзогенными нуклеиновыми зондами могут быть РНК или ДНК, комплементарные к анализируемым клеточным последовательностям. Радиоактивные зонды могут быть получены путем транскрипции *in vitro* с РНК-полимеразой, обратной транскриптазой или ник-трансляции в присутствии предшественников, меченных ^{35}S или ^3H . Коммерческие наборы РНК-полимеразы, ник-трансляции или обратной транскриптазы, содержащие все необходимые реагенты и подробные протоколы для получения меченных изотопами зондов РНК или ДНК, поставляются фирмами Amersham International plc или New England Nuclear Division of DuPont. Возможно также пометить нуклеиновые кислоты ^{125}I . При мечении идентичных зондов РНК ^3H и ^{125}I получаются качественно идентичные картины распределения зерен серебра на радиоавтографах при гибридизации *in situ* [6]; иодированная рибосомальная РНК позволяет получить корреляцию числа зерен при гибридизации с клетками в мейозе в зависимости от содержания ДНК [7].

Можно посчитать, что при обычной гибридизации *in situ* с использованием меченного тритием зонда с удельной радиоактивностью 10^6 распад./мин на 1 мкг уникальный ген размерами около 10^3 пар оснований обеспечит образование одного зерна серебра на автографе после 100 дней экспозиции. Это, безусловно, слишком долгий срок, неприемлемый еще и из-за неблагоприятного отношения сигнал/шум в этих условиях.

При использовании в качестве предшественника одного из нуклеотидов, меченного ^{35}S , можно получить зонды с удельной радиоактивностью 10^9 распад./мин на 1 мкг в системе с обратной транскриптазой или $3 \cdot 10^8$ распад./мин на 1 мкг в системе ник-трансляции. Эти удельные активности пропорционально увеличиваются при использовании двух или трех меченых предшественников, но, когда используются все четыре предшественника, меченные ^{35}S , происходит снижение активности обратной транскриптазы и системы ник-трансляции. При ник-трансляции с использованием ^{125}I -дезокситидина (уд. активность выше 1500 Ки/моль; Amersham или NEN) без носителя удается в настоящее время получить зонды с удельной активностью 10^9 распад./мин на 1 мкг и выше.

2.4. Чувствительность

Обнаружение множественных копий транскриптов гена в цитоплазме фиксированных клеток в отличие от выявления уникальных генов сравнительно слабо зависит от удельной актив-

ности зонда. Однако при выявлении транскриптов гена вступают в силу другие факторы. Так, чувствительность метода гибридизации при локализации специфических клеточных мРНК определяется главным образом степенью их удержания в ходе предшествующих гибридизации манипуляций и доступностью этих РНК для зондов.

2.4.1. Удержание клеточных РНК

Удержание РНК в фиксированных цитологических препаратах анализировали окрашиванием акридиновым оранжевым на каждом этапе предварительной обработки перед гибридизацией [8]. Полученные результаты показывают, что фиксация 2%-ным параформальдегидом обеспечивает более воспроизводимое удержание РНК, чем фиксация смесью этанол/уксусная кислота, предлагавшаяся в исходной методике. Прекрасное удержание РНК достигается при фиксации смесью метанол/ТХУ [9]. Глутаровый альдегид (0,2%-ный) в 0,1 М какодилате натрия, используемый для фиксации криостатных срезов, также обеспечивает стабильное удержание РНК.

2.4.2. Доступность клеточных последовательностей РНК

Доступность клеточных РНК, являющихся мишенями, оптимальна после инкубации клеток или срезов тканей с проназой или протеиназой К. Сразу после протеолитической обработки клетки инкубируют с параформальдегидом для индукции поперечных сшивок экспонированной клеточной РНК с остающимися клеточными компонентами или желатином, покрывающим предметное стекло [10]. Протеолитическая обработка и фиксация параформальдегидом вдвое увеличивают чувствительность выявления мишеней, не влияя на морфологию клеток.

2.5. Усиление сигнала

10%-ный декстрансульфат увеличивает скорость гибридизации зондов ДНК с иммобилизованными нуклеиновыми кислотами. Более того, если ДНК первоначально случайным образом фрагментирована и денатурирована, то декстрансульфат способствует образованию своеобразной сети зонда [11]. Так, например, если пометить ДНК ник-трансляцией [12], а затем денатурировать, то частично комплементарные участки ДНК гибридизируются, образуя обширные сети ДНК. Более того при подготовке проб ДНК путем репликации в плазидах имеет смысл метить всю рекомбинантную молекулу, поскольку последовательности векторной ДНК могут участвовать в формировании сети. Было установлено, что добавление 10%-ного декстрансульфата в используемый при гибридизации буфер приводит

к 4-кратному увеличению чувствительности в обнаружении сигнала.

Сетевые зонды могут быть также сконструированы из поли(А)⁺-содержащих зондов, которые после гибридизации выявляются с помощью ДНК, содержащих хвосты из ¹²⁵I-поли(бром-дезоксинуридина) (например, высокомолекулярных ДНК морских ежей). В образовании сетей ДНК могут также участвовать рассеянные повторяющиеся последовательности [13].

2.6. Эффективность радиоавтографии

Эффективность радиоавтографии в выявлении меченных трием молекул составляет около 5—10%. Нуклеотиды, меченные ¹²⁵I и ³⁵S, обеспечивают более высокую эффективность выявления метки на автографах по сравнению с распадами ³H при сохранении адекватного для многих целей разрешения в световом микроскопе (например, для обнаружения генов вирусов и цитоплазматических мРНК). Меченные ¹²⁵I комплементарные РНК вируса SV40 обеспечивают достаточное количество зерен серебра на автографах после недельной экспозиции, когда с помощью гибридизации выявляется один участок вирусной интеграции на диплоидный набор хромосом [14].

3. Подготовка реагентов и материалы

3.1. Материалы

Покровные стекла диаметром 16 мм

Предметные стекла, покрытые желатином

Выдержите ночь в хромовой кислоте, промойте 2 ч проточной водопроводной, а затем дистиллированной водой. Храните в 70%-ном этаноле. Промойте стекла кислотой, как указано выше. После дистиллированной воды опустите стекла в свежеприготовленные желатиновые хромовые квасцы при комнатной температуре. Дайте стечь избытку квасцов, высушите стекла в помещении без пыли и храните при 4°C

3.2. Основные реагенты

Желатиновые хромовые квасцы

Фосфатный солевой буфер (ФСБ)

Стандартный солевой цитратный раствор (20-кратный)

Метанол
10%-ная ТХУ

Желатин	5 г
Хромовые квасцы	0,5 г
Дистиллированная вода	1 л
NaCl	8,0 г
KCl	0,2 г
Na ₂ HPO ₄	1,14 г
KH ₂ PO ₄	0,2 г
Дистиллированная вода	1 л
Довести pH до 7,3	
Хлорид натрия	175 г
Цитрат натрия	88 г
Дистиллированная вода	1 л
Довести pH до 7,0	

3.3. Реагенты для гибридизации

Раствор каучука (Cow Proofings Ltd., Slough, Berks)	Довести до рабочей консистенции с помощью около 1/10 объема петролейного эфира с точ- кой кипения 60—80 °С
Буфер	Трехкратный стандартный солевой цитратный раствор, содержащий 40% формамида (Fluca), рН 6,5
Зонд	Растворите меченую нуклеиновую кислоту в бу- фере до конечной радиоактивности $5 \cdot 10^7$ рас- пад./мин/мл. При использовании двунитевой кислоты денату- рируйте при 70 °С непосредственно перед ис- пользованием

3.4. Радиоавтография

Пленка Кодак AR-10
Жидкая эмульсия Илфорд К-5D или
L4
Проявитель Кодак D-19
Фиксатор Илфорд Гипам с дубите-
лем
Фосфатный буфер Соренсена 67 мМ
рН 6,9

рН 5,75

KH_2PO_4	4,53 г
Na_2HPO_4	5,93 г
Дистиллированная вода	1 л
KH_2PO_4	0,89 г
Na_2HPO_4	8,38 г
Дистиллированная вода	1 л

Нейтральная смола для заливки
DPX (R. A. Lamb)
Краситель Мэй-Грюнвальда (Gurr)
Краситель Гимза (Gurr)
Гематоксилин (Gurr)
Тартразин (Gurr)

4. Подробный протокол. Гибридизация in situ

Выявление клеточных транскриптов РНК методом гибриди-
зации легко осуществимо и не требует использования зондов
с высокой удельной активностью или усиления сигнала. При-
меняя пропись, представленную ниже, можно добиться успеш-
ной гибридизации.

4.1. Гибридизация in situ

- I. Монослойные культуры можно выращивать на покровных
стеклах или подложках из Терманокса (Lux, Flow Labo-
ratories). Цитологические препараты суспензионных куль-
тур могут быть приготовлены центрифугированием клеток
и помещением их на покрытые желатином предметные
стекла (Shandon, Cytocentrifuge or Damon/IEC Cytobu-



Рис. 9.1. Гибридизация кДНК глобина крыс с периферическими клетками крови анемичных крыс (70% ретикулоцитов по данным суправитального окрашивания). Зонд гибридизуется с большинством безъядерных клеток, тогда как лимфоциты и 28% безъядерных клеток остаются немеченными. Для гибридизации использовалась комплементарная ДНК глобина крыс (получена Эльке Корге; удельная активность $15 \cdot 10^6$ импульс/мин на 1 мкг). Гибридизация в стандартном солевом растворе тройной крепости с 40% формамида при 43°C в течение 18 ч. Постгибридизационная обработка: 0,5 ч в стандартном солевом растворе двойной крепости при 55°C . Выявление гибридов: радиоавтография на пленке Кодак AR-10, 4-недельная экспозиция, проявитель Кодак D19, разведенный равным объемом воды; фиксатор Илфорд Гипам; окраска 25 мин Мэй-Грюнвальд и 25 мин Гимза. Микрофотография на пленку Илфорд Паи F 35 мм.

skets). Могут быть также использованы тонкие криостатные срезы тканей или клеточных осадков.

- II. Зафиксируйте препараты в течение 5 мин в метаноле, после чего трижды промойте 10%-ной ТХУ при 4°C .
- III. Поместите в 70%-ный этанол и затем высушите на воздухе. Покровные стекла следует приклеить к предметным стеклам клетками вверх, используя DPX. Эти образцы в случае необходимости можно хранить при 4°C в течение нескольких недель.
- IV. Перенесите 5 мкл раствора с меченым зондом непосредственно на фиксированные клетки, предварительно прогретые до 43°C (для этого поместите стекла на металличе-

скую поверхность, под которой циркулирует вода при 43°C).

- V. Покройте каплю покровным стеклом диаметром 16 мм.
- VI. Заклейте края покровного стекла раствором каучука.
- VII. После высыхания проверьте визуально качество заклейки и инкубируйте стекла в течение 18 ч на плоской металлической пластинке при 43°C в водяной бане с крышкой. Высокая влажность будет полезна, если непрочно приклеить покровные стекла.
- VIII. В конце периода инкубации охладите препараты на льду и отделите пинцетом резиновую заклею от покровного стекла.
- IX. Удалите покровное стекло под поверхностью двукратного стандартного солевого цитратного раствора или смойте покровное стекло струей этого раствора.
- X. Заложите предметные стекла в держатель и опустите в стеклянную кювету с двукратным цитратным раствором. Заклейте крышку липкой лентой.
- XI. Частично погрузите кювету в водяную баню при 55°C на 30 мин.
- XII. Промойте стекла двукратным стандартным солевым цитратным раствором (18°C) 4 раза.
- XIII. Проведите для обезвоживания через серию спиртов вплоть до абсолютного этанола и высушите на воздухе.
- XIV. Выявите гибриды радиоавтографией, используя пленку или жидкую эмульсию.

Условия гибридизации и последующая тепловая обработка должны обеспечивать достаточную строгость связывания, позволяющую избежать неспецифического связывания меченого зонда.

5. Радиоавтография

Фотографическая эмульсия может быть нанесена на стекло с клетками либо путем наложения полоски с эмульсией на основе желатина, либо погружением стекла в жидкую эмульсию.

Снимающаяся пленка Кодак AR-10 (Kodak) представляет собой преформированный слой желатина, нанесенный на стеклянную подложку. Для проведения радиоавтографии пленка легко отделяется от стекла при безопасном красном освещении. Такая пленка обеспечивает только один размер кристаллов и, следовательно, только один уровень чувствительности. Составляющий основу пленки желатин делает окраску клеток после радиоавтографических процедур несколько более сложной, чем при использовании жидких эмульсий.

При втором способе ядерная эмульсия расплавляется в водяной бане. Эмульсия Илфорд K-D5, не требующая разведения, может быть использована при желто-коричневом безопасном

свете. Предметные стекла погружают в эмульсию, образующую тонкую пленку над образцом. Радиоавтографы относительно легко красить, поскольку желатин эмульсии образует очень тонкий слой. Чувствительность метода при использовании эмульсий широко варьирует, так как образуются зерна серебра разных размеров. При таком способе, впрочем, труднее обеспечить постоянную толщину слоя эмульсии, чем при использовании преформированных пленок.

5.1. Радиоавтография с пленкой Кодак AR-10

- I. Разрежьте пленку AR-10 скальпелем на полосы размером приблизительно 40×25 мм.
- II. Отделите полосы от стеклянной подложки и поместите их на поверхность дистиллированной воды при 26°C на 3 мин слоем эмульсии вниз, чтобы эмульсия в воде набухла.
- III. Предметные стекла с препаратами подведите в воде под пленку эмульсии. Поднимите стекло таким образом, чтобы пленка оказалась в тесном контакте с препаратом и свешивалась с краев стекла.
- IV. После высушивания на воздухе экспонируйте пленку при 4°C в светонепроницаемой коробке с силикагелем.
- V. После экспозиции проявите пленку, погружая стекла при 18°C на 5 мин в проявитель Кодак D19, разведенный в 2 раза дистиллированной водой.
- VI. Не промывая, зафиксируйте автографы, погружая их при 18°C на 3 мин в фиксатор Илфорд Гипам, содержащий кислый дубитель.
- VII. Промойте проточной водой и поместите на 2 мин в промывающий агент Гипо (Kodak).
- VIII. Осторожно промойте 5 мин холодной проточной водой при $10\text{--}18^\circ\text{C}$ и высушите на воздухе.

5.2. Окрашивание радиоавтографов с пленкой

- I. Окрасьте автографы красителем Мэй-Грюнвальд вдвое разбавленным 67 мМ фосфатным буфером Соренсена pH 5,75 в течение 25 мин при 18°C . Для предотвращения отложения осадка, который может образовываться вследствие постепенного окисления красителя, предметные стекла погружайте и окрашивайте в вертикальном положении. Во избежание загрязнений препаратов окисленной пеной, образующейся на поверхности раствора красителя, не следует вынимать стекла вплоть до конца окрашивания. По окончании окраски имеет смысл заполнить кювету с красителем избытком буфера при 18°C , чтобы пена стекла через края кюветы.

- II. Выньте стекла и окрасьте их в 5%-ном красителе Гимза (Gurr) в буфере рН 5,75 в течение 25 мин при 18°C. Следует предпринимать те же предосторожности, что и при предыдущем окрашивании.
- III. Осторожно промойте стекла в холодной воде, высушите и заключите в смолу DPX.
- IV. Можно также окрасить автограф в гематоксилине в течение 2 мин и затем 15 мин промыть медленно текущей холодной проточной водой при 10—18°C. Затем автографы следует отдифференцировать в тартразине в течение 5 мин, промыть, высушить и заключить в DPX.

5.3. Радиоавтография с жидкой эмульсией (См. также гл. 7.)

- I. Покройте стекла эмульсией, расплавленной при 50°C и разбавленной в 3 раза дистиллированной водой при 50°C (если это рекомендуется инструкцией производителя эмульсии).
- II. Дайте стечь эмульсии и сотрите ее с обратной стороны стекла.
- III. Высушите на воздухе и поместите в светонепроницаемый ящик при 4°C. Во избежание быстрого обезвоживания тонкого слоя эмульсии и последующего растрескивания рекомендуется вносить в ящик силикагель, но не ранее чем через 24 ч. Экспонируйте препараты в течение необходимого времени.
- IV. Обработайте радиоавтографы, как указывалось выше.

5.4. Окраска радиоавтографов, покрытых жидкой эмульсией

- I. Окрасьте 15 мин в красителе Мэй-Грюнвальд, разбавленном в три раза буфером Соренсена рН 6,9 при 18°C.
- II. Промойте буфером и окрасьте в 5%-ном красителе Гимза рН 6,9 при 18°C в течение 15 мин. Следует придерживаться методик, позволяющих избежать неспецифического отложения красителей.
- III. Осторожно промойте в холодной воде, высушите на воздухе и заключите в смолу DPX.
- IV. Можно также окрашивать гематоксилином и тартразином, как указывалось выше.

Более подробную информацию о радиоавтографии можно получить в обзоре, предоставляемом Amersham International [15].

6. Выявление молекулярных гибридов в цитологических препаратах с помощью методов, не использующих радиовзвешивающую метку

Другие методы выявления гибридизуемых *in situ* клеточных транскриптов с использованием флуоресцентных или конъюгированных с ферментом зондов обладают рядом преимуществ по сравнению с обычной процедурой радиоавтографического выявления. Эти преимущества заключаются в следующем: (I) резко сокращается время, необходимое для определения участка гибридизации из-за отсутствия периода экспозиции радиоавтографов; (II) методы выявления флуоресценции обеспечивают более высокое разрешение, чем при использовании радиоавтографов; (III) при отказе от радиоавтографии часто удается увеличить отношение сигнал/шум.

Простейший из этих методов выявления использует в качестве зондов частично апуринизированные ДНК в комплексе с акрифлавином [16]. Последний может быть выявлен по флуоресценции после гибридизации *in situ*. Рудкин и Столлар [17] предложили использовать специфическую иммунную сыворотку кроликов против двунитевых гибридов ДНК/РНК, образующих комплекс с метилированным БСА. Эти комплексы затем выявляли *in situ* с помощью конъюгированных с родамином антител к кроличьим иммуноглобулинам G. Мэнинг с сотрудниками [18] предложили новую систему обнаружения, использующую биотин, ковалентно связанный с зондами нуклеиновых кислот. Участки гибридизации, содержащие биотинилированную РНК, метили полиметакрилатным латексом, ковалентно связанным с авидином, который обладает высоким сродством к биотину. Частицы латекса затем выявляли сканирующей электронной микроскопией; чувствительность метода оказывалась пропорциональной количеству частиц, связанных в участке гибридизации нуклеиновых кислот. Более чувствительная система была предложена Ченгом с сотрудниками [19], использовавшими интенсивно флуоресцирующие частицы латекса, конъюгированные с полиуридиловой кислотой. Перед гибридизацией *in situ* их отжигали с 3'-концами комплементарных РНК, используемых в качестве зондов. Выявление образующихся двойных гибридов проводилось с помощью обычной флуоресцентной микроскопии. Позднее Лангер с сотрудниками [20] синтезировали аналоги дезоксиуридин-, или уридинтрифосфата, содержащего биотин, ковалентно пришитый в положение С-5 пиримидинового кольца через «линкерные» аллиламиновые группы. Биотинилированные аналоги дезоксиуридинтрифосфата (dUTP) могли затем включаться в зонды ДНК путем ник-трансляции. Использование таких полинуклеотидов при гибридизации *in situ* обеспечивало более высокое разрешение и лучшее отношение сигнал/шум [21]. Для

выявления таких зондов после гибридизации можно использовать два метода: (а) иммунологический, с применением антител к биотину и последующим нанесением вторых антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой, ферментом или электроноплотным реагентом, и (б) аффинное мечение, использующее преформированные комплексы родамина, конъюгированного с авидином, или авидина с биотинилированными производными пероксидазы или щелочной фосфатазы. Биотинилированный dUTP для использования в ник-трансляции в комплексе с авидином и биотинилированной щелочной фосфатазой в качестве системы обнаружения ДНК поставляется фирмой Bethesda Research Laboratories.

7. Благодарности

Экспериментальные исследования, описанные в этой главе, обеспечивались субсидией Компании раковых исследований.

Литература

1. Gillespie D., Spiegelman S. (1965). *J. Mol. Biol.*, **12**, 829.
2. John H. A., Birnstiel M. L., Jones K. W. (1969). *Nature*, **223**, 582.
3. Gall J. C., Pardue M. L. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 378.
4. Harrison P. R., Conkie D., Paul J., Jones K. (1973). *FEBS Lett.*, **32**, 109.
5. Conkie D., Affara N., Harrison P. R., Paul J., Jones K. (1974). *J. Cell Biol.*, **63**, 414.
6. Attenburg L. C., Getz M. J., Crain W. R., Saunders G. F., Shaw M. W. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1536.
7. Wolgemuth D. J., Jagello G. M., Atwood K. C., Henderson A. S. (1976). *Cytogenet. Cell Genet.*, **17**, 137.
8. Hafen E., Levine M., Garber R. L., Gehring W. J. (1983). *EMBO J.*, **2**, 617.
9. Birnie G. D., Burns J. H., Clark P., Warnock A. M. (1984). *J. R. Soc. Med.*, **77**, 289.
10. Singer R. H., Ward D. C. (1982). *Proc. Natl. Sci. USA*, **79**, 7331.
11. Wahl G. M., Stern M., Stark G. R. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3683.
12. Rigby P. W. J., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. (1977). *J. Mol. Biol.*, **113**, 237.
13. Tereba A., Lai M. M. C., Murti K. C. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6486.
14. Szabo P., Ward D. C. (1982). *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 425.
15. Rogers A. W. (1979). Partial autoradiography, available as Review 20 from Amersham International.
16. Levinson J. W., Desostoa A., Liebes L. F., McCormick J. J. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **447**, 260.
17. Rudkin G., Stoller B. (1977). *Nature*, **265**, 472.
18. Manning J. E., Hershey N. D., Broker T. R., Pellegrini M., Mitchell H. K., Davidson N. (1975). *Chromosoma*, **53**, 107.
19. Cheung S. W., Tishler P. V., Atkins L., Sengupta S. K., Modest E. J., Forget B. G. (1977). *Cell Biol. Intl. Rep.*, **1**, 255.
20. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6633.
21. Langer-Safer P. R., Levine M., Ward D. C. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4381.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Общие реагенты

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный)

CaCl ₂	0,14 г	(1,26 мМ)
KCl	0,40 г	(5,36 мМ)
KH ₂ PO ₄	0,06 г	(0,44 мМ)
MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,10 г	(0,49 мМ)
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,10 г	(0,41 мМ)
NaCl	8,00 г	(0,137 М)
Na ₂ HPO ₄ ×7H ₂ O	0,09 г	(0,34 мМ)
Феноловый красный	0,01 г	
Вода до	1000 мл	

Автоклавировать при pH ниже 6,5 (давление ~1 атм) 20 мин. Перед использованием довести pH до 7,4 стерильным NaOH. Можно использовать в качестве буфера стерильный 1 М HEPES, разводимый до 20 мМ.

При необходимости добавления глюкозы ее следует автоклавировать отдельно в концентрации 100 г/л и при добавлении разбавлять до концентрации 1 г/л ($5,55 \cdot 10^{-3}$ М).

Приготовленный по этой прописи раствор применяется для общих работ, промывания и препарирования. При использовании в качестве основы для ростовых сред в него следует добавлять глюкозу (см. выше) и NaHCO₃ в концентрации 0,35 г/л (4 мМ). В таком виде он пригоден для культивирования в закрытых сосудах с воздухом в качестве газовой фазы.

Фосфатный солевой буфер в модификации Дюльбекко, раствор А (ФСБА без Ca²⁺ и Mg²⁺)

KCl	0,20 г	(2,68 мМ)
KH ₂ PO ₄	0,20 г	(1,47 мМ)
NaCl	8,00 г	(0,137 М)
Na ₂ HPO ₄ ×7H ₂ O	2,16 г	(8,06 мМ)
Вода до	1000 г	

Стерилизовать автоклавированием (давление ≈1 атм) 20 мин. Использовать для промывания перед дезагрегацией и для разведения трипсина.

Сбалансированный солевой раствор для препарирования

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса или ФСБА с пенициллином (250 ед/мл), стрептомицином (250 мкг/мл), канамицином (100 мкг/мл) или гентамицином (50 мкг/мл) и фунги-зоном (2,5 мкг/мл).

ФСБА/ЭДТА

Na ₂ ЭДТА	0,372 г	(1 мМ)
ФСБА до	1000 мл	

Стерилизовать автоклавированием при 1 атм 20 мин.

Трипсин

2,5 г (грубый Дифко 1/250) или 0,1 г (трижды перекристал-лизированный, Sigma).

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса или ФСБА или ФСБА/ЭДТА до 1000 мл, как потребуется для получения пол-ной дезагрегации.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абрин 263
Авидин 315
Агар мягкий, клонирование опухолевых клеток 262
— субстрат в органной культуре 215
Агарового геля техника, органная культура 225
Агароза, заключение инкапсулированных клеток 107
Агрегация клеток, предотвращение 96
Адаптация суспензионной культуры 95
Аденозиндезаминаза, аллоферменты 138
Адриамицин при определении цитотоксичности 272
Азот жидкий, замораживание клеток 111, 113
Азотистый иприт, противоопухолевое действие 257
Акридиновый оранжевый 204—206, 307
Акрифлавин 314
Актимицин D, анализ цитотоксичности 272
Аллоферменты 138, 140
Альбумин 38, 48, 51, 167
Альгинат, заключение инкапсулированных клеток 106—107
Американская коллекция типовых культур (ATCC), банк данных 109—110
Андрогены в культуре предстательной железы 238
Антигены гистосовместимости и групп крови 142
— мембранные, определение 208
— тканеспецифические, выявление 152
Антиметаболиты, цитотоксическая активность 278
Антитела, метод флуоресцентных антител 208
Анеуплоидность культуры клеток 17
Ацетат вискозы 216
Ацетоорсеин в кариологическом анализе 125
Аэрация поверхностная 68—69, 93
Банки данных о гибридомах CODATA-IUIS 163
— линий клеток, создание 109—110
Белки в монослое, тест на цитотоксичность 287
— окрашивание ФИТЦ 207
— синтез, органная культура 249
— — определение цитотоксичности 273
— содержание и определение цитотоксичности 276
— транспортные 38
3,4-бензпирен, влияние на легкие плода человека 241
Бикарбонат, концентрация в культуре 19
Биоматрикс в бессывороточной среде 44
Биопсийный материал, первичная культура 260
Биотин 315
Блеомицин, тест на цитотоксичность 272
Бромдезоксимуридин, анализ клеточного цикла 206
Бронхи, органная культура 217, 239—240
Варбурга аппарат 270
Вейбеля — Палада тельца 147
Винбластин 263, 265—267
Винкристин 272
Вирусное загрязнение культуры, тесты 133
Витамины А 222, 238
Витамины, роль в культуре 38
Вода деионизированная 21
— дистиллированная 21

Водяная рубашка 100
Вращающиеся бутылки 78—79
Выживаемость 268, 273, 280

Газовая фаза, определение 19
Галактоза в среде для наращивания клеток 65
Гаулоринидаза, дезагрегация солидных тканей 198
Гель-электрофорез в крахмальном геле, анализ изоферментов 120
Гематоксилин-эозин, окрашивание при световой микроскопии 244
Генетическая нестабильность при создании банка клеточных линий 110
Гепарин 218
Гепатоциты, влияние субстрата 45
Гетероплоидность постоянной клеточной линии 17
Гибридизация молекулярная 304
— реагенты 309
— *in situ* 304, 309
Гибридома, отбор клеточных линий 155
— предпочтительное pH 65
— при культивировании 42
— сохранение, характеристика 109
Гибриды молекулярные, выявление 314
Гидрокортизон в культуре клеток млекопитающих 29
— и органных культурах 240
4-гидропероксициклофосфамид, активация микросомных препаратов 279
Гимза, кариологический анализ 124
— окраска хромосом 144
Гипофиз, органный культура 217
Гистограммы при цитометрии 195
Гликозамингликаны, клеточно-субстратная адгезия 44
Гликолиз при определении цитотоксичности 270
Гликолипиды, ШИК-реакция 244
Гликопротеины, клеточный субстрат 44
— окрашивание реактивом ШИК 244—246
Глицерин, криопротектор 111
Глутамат-оксалоацетат — трансаминазы 2, перекрестное загрязнение культуры 141
Глюкоза, значение концентрации в культуре 66
— и наращивание клеток 64
— при исследовании цитотоксичности 273
Глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназа,

аллоферменты, определение фенотипа 138
— изоферменты 120
Глюкозофосфатизомераза 1, межвидовое перекрестное загрязнение 141
Глюкокортикоиды в бессывороточной среде 47
— роль и культуре клеток 29
Гормоны в бессывороточной среде 46, 51
— и органный культура 222
— добавки к основной среде 43
— и клеточная дифференцировка 12
— роль в культуре клеток 29
— стероидные 29
— щитовидной железы 29
Грибы, загрязнение культуры 126
Группа крови, тесты на антигены 142

Дакарбазин 263
Дезагрегация, приготовление первичной культуры 22
— солидной ткани 199
Дексаметазон, роль в культуре клеток 29
Декстрансульфат, усиление сигнала 307
Десмосомы, идентификация исходных тканей 147
Диастаза 246
Дигидротестостерон в предстательной железе 238
Диметилсульфоксид, криопротектор 111
Диоксид углерода (CO_2), парциальное давление 19
Дипептидаза 1, межвидовое перекрестное загрязнение 141
Диспаза, дезагрегация солидных тканей 198
Дифференцировка 12
Диффузия через мембраны, насыщение культуры кислородом 70
ДНК, гибридизация *in situ* 306
— окрашивание 202—206
— — Хехст 33258 и 33342 206—207
— при определении загрязнения культуры микоплазмой 25
— рекомбинантная, клонирование 305
— сателлитная, выявление 305
— синтез, органный культура 249
ДНКазы, дезагрегация солидной ткани 199
Дрожжевой экстракт, обнаружение микоплазмы 128
Дыхание, в тесте на цитотоксичность 270

- Желатин 105, 307
 Жизнеспособность 256—302
 — интерпретация результатов 268—269
 — эксплантатов 228
 Жирные, кислоты, включение в бесывороточную среду 52
- Замораживание клеток 110—118
 Зимограммы аллоферментов 140
 Зонды нуклеиновые 305—306
- ИД₅₀, определение цитотоксичности 280, 296
 — противораковых препаратов 265—266
 ИД₉₀, определение цитотоксичности 296
 — тест на выживание 281
 Изоферменты, подтверждение вида 120
 — полиморфизм, выявление перекрестного загрязнения 141
 — электрофорез 138
 Изокитрат-дегидрогеназа 1, межвидовое загрязнение 141
 Изоэлектрофокусирование, идентификация иммуноглобулинов 158
 Изонзимология 138
 Иммуноглобулины, идентификация 157—159
 Иммунодиффузия радиальная 157
 Иммунологические продукты, определение 155—156
 Иммуофлуоресцентное окрашивание клеточной поверхности 208
 Инсулин в бесывороточной среде 46—47
 — в органной культуре 240
 — в среде для оптимизации роста 51
 — значение для культивирования 29
 — использование в технике сеток 232
 Интерферон, образование в культуре 42
- Кальций (Ca²⁺) в культуре клеток 12
 Канцерогенные агенты в органной культуре 222
 — углеводороды в ткани человека 238
 Канцерогены, взаимодействие с витамином А 238
 Карбоксиметилцеллюлоза, использование для наращивания клеток 60
- Кариологический анализ, подготовка клеток 124
 Кариотип и выбор среды 43
 Карцинома легких, окрашивание ДНК 203
 — молочной железы, радиоиммунологический анализ 152
 Катарактные ножи 220
 Кератиновые филаменты 147
 Кинетика роста клеток животных при наращивании 62
 — — кривые 23
 — — связь с окислительно-восстановительным потенциалом 71
 Кислород (O₂), значение для наращивания клеток 67
 — насыщение культуры 70
 — парциальное давление 19
 — потребность в нем 43, 67
 — предотвращение некроза 214
 Клетки, агрегация 64—65
 — анализ чистоты линий 118, 120, 124
 — в культуре, происхождение и характеристика 10—12
 — выживание 43
 — дифференцировка и пролиферация 11
 — животных, наращивание 56—107
 — жизнеспособность 58, 116
 — — при размораживании 115
 — зависимость от субстратов 56, 74
 — замораживание 110—118
 — из различных тканей, суспензии 197—198
 — иммуофлуоресцентное окрашивание поверхности 208
 — кинетика роста 23
 — культивирование см. Культивирование клеток
 — культуры см. Культуры клеток
 — маркеры 10
 — методы разделения 166
 — наращивание, необходимые факторы 97
 — — оборудование 58
 — — практические советы 61
 — — неокрашенные, светорассеяние 201
 — — определение количества 57
 — — плотность, необходимая для наращивания 61
 — — прикрепление к поверхности сосуда 76—77
 — — использование фибронектина 76
 — — пролиферация, тест на цитотоксичность 274
 — — разделение 166
 — — реагенты для наращивания 58

- резистентность к химиотерапевтическим агентам 261
- сбор 177
- светорассеяние, флуоресценция 191
- сортировка, значение размера клеток 192
- — проточная цитометрия 182—183
- сохранение и оценка качества 108—164
- стволовые 11
- — дифференцировка 14
- — клонирование 262—264
- стромы, примесь в культурах 260, 262, 273
- — разрастание 260
- трансформированные *см.* Трансформированные клетки
- условия дифференцировки 12
- эпителиальные, графики роста 92
- Клеточные линии (клеточная линия), анализ чистоты 118, 120, 124
- — банки данных 109—110, 162
- — дифференцировка 12
- — иммунологические продукты 156
- — межвидовое перекрестное заражение 108, 137
- — ограниченная 16
- — определение 16
- — опухолеродность 17
- — подтверждение вида 118—120, 124
- — постоянные 16, 17
- популяции гетерогенные, разделение 177
- суспензия, фиксация 201
- Клеточный сортер с активированной флуоресценцией 189
- — FC400 188
- — FACS440 189—191
- цикл, анализ 206
- фазы 178
- Клонирование в монослое 273, 281
- в мягком агаре 262, 274
- эффективность 116
- Кожа, органическая культура 215, 234
- Коллаген, внеклеточный матрикс 45
- как субстрат, в бессывороточной среде 44
- оптимизация среды 49
- покрытие поверхности культуральной посуды 53
- при культивировании клеток 12
- — эмбриона 229
- роль в культуре клеток 29
- Коллагеназа, дезагрегация солидных тканей 199
- использование в первичной культуре 22
- Колонистимулирующие факторы, роль в культуре клеток 29
- Компьютер в проточной цитометрии 183
- Кориолиса силы 173
- Краситель, определение целостности мембраны 270
- Криопротекторы 111
- Криостатные срезы, гибридизация *in situ* 310
- Кровь при цитометрии 197
- Культивирование клеток, принципы стерильной работы 10—25
- — рост-лимитирующее вещество 102
- тканей человека 238
- Культуральная посуда, покрытия поверхности 53
- Культуральные системы 82
- — типы 72
- — сосуды 20
- — и их поверхности 58
- Культуры (культура) врастающие 78—79
- клеток, заражение перекрестное 25
- — инкапсулированных 105
- — создание банка 109—110
- — сравнение с органической культурой 13—14
- — стационарная фаза 61
- — монослойная 74
- — легкость перфузии 76
- — приготовление 23
- — применение 261
- на полых волокнах 81
- насыщение кислородом 69, 92
- непроточные 72—73
- органа *см.* Органическая культура
- первичная *см.* Первичная культура
- перемешиваемые, аэрация 69
- проточные
- старение 109
- статические 68, 96
- суспензионные 17, 56, 94—97
- — чувствительность к химиотерапевтическим агентам 260
- эмбрионов, тератологические исследования 228
- Куриная плазма, получение 219
- Куриный эмбрион, получение эксплантатов 219
- — — экстракта 218
- Лаг-период, кинетика роста 23
- Лазеры, использование в цитометрии 182—185, 189

- двухлазерный измерительный блок 184
- Лактатдегидрогеназа, изоферменты 120
- Ламивив, клеточный субстрат 44
- Лекарственные агенты (лекарства, лекарственные препараты), активация 279
- анализ токсичности, трудности 297
- — выбор концентрации 264
- — зависимость эффекта от концентрации 294
- — определение цитотоксичности 280, 285
- — оценка действия 259—260
- — подавление метаболизма, восстановительный период 268
- — продолжительность воздействия 265
- — противораковые 277—278, 300
- — связывание с фильтрами 277
- — скрининг, автоматизация 300
- — фармакокинетические данные 264
- — цитотоксичность 276—280, 288, 300
- — чувствительность к ним 259 — 260
- Лецитин 40
- Лимфоциты, образование в бессывороточной среде 42
- Липиды, роль в культуре млекопитающих 39
- Логарифмическая фаза роста 23
- Магнитные мешалки 88, 97
- Макинтоша и Филдса сосуд 236—237
- Максимова метод 223
- Мезенхима, вдувка предстательной железы 228
- Мезотелий, примесь в культуре опухоли 261
- Мелавома, ксеноинкубатор, чувствительность к лекарствам 263
- Мембраны, целостность 269—270
- Метиленовая синька 270
- Метилцеллюлоза 61
- Метод(ы) висцеральной капли 223
- «Куртвей» 284
- одиночного предметного стекла (метод Максимова) 223
- плотика 216, 222
- погружения в эмульсию 248—252
- сгустка 222
- сеток см. Техника сеток
- флуоресцирующих антител 208
- Метод часовых стекол см. Техника часового стекла
- эмбриологического часового стекла 225
- Метотрексат, фармакокинетика 266
- Мешалки для выращивания клеток в суспензии 88
- Микоплазма, заражение культуры клеток 108
- определение 25, 128—133
- Микробное заражение культуры клеток 24, 126
- Микроденситометрия, сравнение с проточной цитометрией 182
- Микровосител, аппарат для культивирования 88
- в цитодексе 87
- наращивание культур 91
- Микроскопия световая, оргавная культура 242
- Микрофлуориметрия, сравнение с проточной цитометрией
- Микроэлементы 47—48, 52
- Минеральные вещества в культуре 40
- Митогены 42
- Митомини, определение цитотоксичности 272
- Митрамицин, окрашивание ДНК 204
- Многоядерный блок 81
- Молочная железа, агитивы 152
- — оргавная культура 217
- — человека, оргавная культура 239—240
- Моноклональные антитела 42
- Морфогенез клеток, изучение 227
- Мочевой пузырь 238
- Мукополисахариды, окрашивание реактивом ШИК 244
- Мукопротеины, окрашивание реактивом ШИК 244
- Мутантные клетки человека, клеточный банк 162
- Нафталиновый червь 270
- Некроз в эксплантатах 214
- Неорганические ионы, потребность у клеток 43
- Нигрозин, определение целостности мембраны 270
- Ник-травляющая 315
- получение зондов 306
- Нонидет Р40 204
- Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), синтез в суспензионной культуре 260
- Нуклеозидфосфорилаза, изоферменты 120

- ³H-нуклеотид, включение в нуклеиновые кислоты, определение цитотоксичности 291
- Окислительно-восстановительный потенциал, связь с кинетикой роста 71
- Окогены, предосторожности при работе с опухолевыми клетками 110
- Ооциты амфибий 305
- Оптика для культивирования, очистка 232
- Оптическая скамья двухлазерная 191
- Опухолевая ткань, дифференцировка 15
- Опухоли, биопсийный материал, преимущества 260—261
- солидные, дезагрегация 200
- человека, образование сфероидов 259—260
- Органная культура 11, 13, 214—254
- — количественная оценка 252
- — преимущества и недостатки 253
- — применение 259
- — световая микроскопия 242
- — сравнение с культурой клеток 13—14
- Ортоцитофлуорограф 184—189
- Осмоляльность 43
- Охтерломи тест 155
- Параформальдегид, фиксация последовательностей РНК 307
- Пептидаза D, аллоферменты 138
- Первичная культура 16, 22—23
- Перфузируемые многослойные культуры 11
- Перфузия по замкнутому контуру, система 91
- среды, монослойная культура 76
- — насыщение O₂ 70
- — непроточная культура 73
- — питание культуры 64
- Пируват 52
- Пищевод человека, органическая культура 239—240
- Плазма крови кур, получение экстракта 221
- — сгустки 215
- — — использование в приготовлении первичной культуры 22
- Пластиковая пленка 83
- Пластиковые мешки 82
- Пластинчатый теплообменник 83
- Пластины, наращивание клеток в монослое 80
- Пленка Кодак AR-10 312
- Плуроник F-68 61
- Полиамин-оксидаза, потенциальная цитотоксичность 41
- Поли-D-лизин 49, 52
- Полисахариды, окрашивание реактивом ШИК 244
- Полистерол как субстрат 19
- Полярность клеток, значение при дифференцировке 12
- Почки, органическая культура 217
- Предстательная железа, антиген 152
- — индукция стероидом 228
- — культивирование 236—238
- — — органическая культура 233—234
- Прибор FC210 186—187
- Пробулькивание, насыщение культурой кислородом
- Проназа, дезагрегация солидных тканей 198
- Пропидийиодит, окрашивание ДНК 202—204
- Простагландины в культуре клеток 40
- Процессор сигналов (данных) 188
- Посевной запас 109
- Посуда пластмассовая в качестве субстрата 20
- стеклянная, обработка поверхности 58—59
- — стерилизация и мытье 20, 21
- «Равновесное» состояние культуры 102
- Радиоавтография 311—313
- жидкая эмульсия 313
- метод погружения в эмульсию 248
- окрашивание 312—313
- определение цитотоксичности 273
- органическая культура 248—249
- реагенты 308
- РНК 304—315
- Радиоактивные изотопы в исследовании цитотоксичности 271
- Радиоиммунный анализ, антигены 152
- Реактор гетерогенный 86
- — со стеклянными бусами 84
- Репродуктивная целостность 273
- РНК клеточные, специфические последовательности 304—315
- окрашивание акридиновым оранжевым 204
- последовательность, фиксация 307
- синтез, в органической культуре 249
- РНК-полимераза, получение зондов 306
- Родамин в методе флуоресцентных антител 208

Рост, кинетика *см.* Кинетика роста
Ротор элютриаторный 168—169

Сбалансированный солевой раствор 317

— — — Хэнкса 316

Светорассеяние, измерение в проточной цитометрии 182

— неокрашенных клеток 201

— сортировка клеток 191

Селен 40

Селенит 46, 51

Силы сдвига 98

Скелетные ткани 10

Соматомедины 28

Среды (среда) культуральные 21, 43, 60

— — — бессывороточные 18, 27—54

— — — коммерческие 52

— — — преимущества и недостатки 40—41

— — — выбор 17, 48

— — — оптимизация 49—51

— — — отбор проб 60

— — — перфузия, насыщение кислородом 70

— — — питательные вещества 63

Стационарная фаза клеточной культуры 61

Стеклянная посуда *см.* Посуда стеклянная

Стеклянные бусы, наращивание клеток 83

— трубки 80

Стерилизация посуды 21, 173

Субкультивирование 16, 23

Субстрат(ы) 19—21

— в бессывороточной среде 44

Сфероиды 11, 259, 274

— анализ выживания 274

— — цитотоксичности

Сцинтилляционная жидкость 290

Сыворотка в культуре клеток млекопитающих 28, 38—40

— в постоянной культуре клеток 17

— заместители 52

— использование в ростовой среде 18

— недостатки и преимущества 40

— роль при культивировании 27—42

Танталовая сетка 216

Тератологические исследования, культуры эмбрионов 228

Тестостерон и предстательная железа 51, 228, 238

Тетразолий, соли 284

Техасский красный, сортировка клеток 191

Техника сеток 216, 230

— часового стекла 215, 217—223

— — — эмбриологического 215, 225

³H-тимидин при определении токсичности 272

Ткани птиц, культивирование 221

— солидные, дезагрегация 198

Токсические метаболиты, влияние на выход клеток 61

Транскриптаза обратная 306

Трансферрин 46, 48, 51

— роль в культуре клеток 39

Трансформация 16—17, 110

— неопластическая 16—17

Трансформированные и нетрансформированные клетки 42—43

Трахея, органная культура 234

Триодтиронин 29

Трипсин 22, 198, 317

Триптофановый синий, определение целостности мембран 270

Троувелла метод, модифицированный 230—231

Трубки соединительные 59

Турбидостат 102

Турбина с плоскими лопастями 88

Углекислота *см.* Диоксид углерода

³H-уридин, при определении цитотоксичности 272

Урогенитальный синус в морфогенезе 228

Уротелий, культура 238

Фаза плато, кинетика роста 23

Фактор(ы) адгезии 44

— прикрепления 29

— распыливания в культуре клетки 29

— роста 51

— — гематопоетические 29

— — добавки к основной среде 43

— — и пролиферация клеток 12

— — нервов 12

— — при наращивании клеток 64

— — роль в культуре клеток млекопитающих 29

— — синтезируемые в тромбоцитах 12

— — фибробластов (ФРФ) в бессывороточной среде 46, 51

— — эпидермиса (ФРЭ) 12, 29, 46, 51

- Фармакокинетические исследования 264—265
 Фенотипический сдвиг 109
 Ферментер(ы) 83
 — с перемешиванием 100
 — с эрлифтом 105—107
 Ферменты, дезагрегация солидных тканей 198
 Фетуин 51
 Фибробласты 10—11. *См. также* Фактор роста фибробластов
 — примесь в культуре опухолей 261
 — рост, влияние сыворотки 41
 Фибронектин, в монослойной культуре 76
 — оптимизация среды 49
 — покрытие культуральной посуды 53
 — роль в культуре клеток млекопитающих 29
 — фактор адгезии 44
 Фидерные клетки 274, 284
 Фиколл, разделение клеток 167
 Фиколл-Гипак, анализ крови 198
 Фикоэритрин, сортировка клеток 191
 Фильтрация среды, последствия 48
 Фильтры миллипоровые в методе плотика 216
 — несмачиваемые 60
 — поляризационные 191
 — при определении цитотоксичности лекарственных препаратов 277
 Флуоресценция в методе флуоресцентных антител 208
 — в тесте на цитотоксичность 269
 — сортировка клеток 191
 Флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), окрашивание белков 207
 Флуоресцентные антитела 118, 208
 — зонды 182
 Флуоресценция активируемая 189
 — при цитометрии 182, 185, 189, 191
 Флюорография, определение синтеза белков 290
 Фосфатный солевой буфер 316
 Фосфоглюкомутаза, аллоферменты 138, 140
 6-Фосфоглюконатдегидрогеназа 138
 Фосфолипиды, роль в культуре клеток млекопитающих 40
 Фотоэлектронные умножители (ФЭУ) 185
 5-Фторурацил в тесте на цитотоксичность 272
 Хелатирующие агенты, дезагрегация солидных тканей 199
 Хемостат 102
 Хёхст (33258 и 33342), анализ клеточного цикла 206—207
 — выявление микоплазмы 128
 — окрашивание ДНК 207
 Химиотерапевтические агенты, исследование активности культуры 260
 — противоопухолевые агенты, стабильность растворов 265—267
 Холестерин, роль в культуре клеток млекопитающих 38, 40
 Хоидронектин 44
 Хром (^{51}Cr), при определении цитотоксичности 269—270
 Хромосомная нестабильность в постоянной клеточной линии 17
 Хромосомы, анализ, G-сегментирование 144
 — — по Гимза 124
 ХЦНМ, противоопухолевое действие 263
 Центрифугирование изопикническое 166
 — скоростное 167
 — элютриационное 167
 Циклофосфамид 272, 279
 Цисплатин 272
 — чувствительность опухолей 261
 Цитогенетика, анализ чистоты линий 118, 124
 Цитограммы 188, 195
 Цитодекс 87, 92
 Цитометрия проточная 182—210. *См. также* Цитограммы
 — — клеток HL60 178—180
 — — оборудование 183
 Цитоскелет, белки 150
 Цитотоксическая активность антиметаболитов 278
 Цитотоксичности индекс 294
 Цитотоксичность 256—302
 — интерпретация результатов 268, — 269
 — методы анализа 287, 291
 Цитофлуорограф 184—189
 Цитохром P450, активация лекарственных веществ 279—280
 Цитрат, хелатирующий агент 199
 Часовое стекло *см.* Техника часового стекла
 Шейка матки, органный культура 217, 239—240

ШИК-реакция 244

Щитовидная железа, органная культура 217

ЭГТА, дезагрегация солидной ткани 199

ЭДТА, дезагрегация солидной ткани 199

Эксплантаты, культивирование 217
— получение 219, 233

Экспоненциальный рост культуры 23

Эластин, дезагрегация солидной ткани 198

Электрофорез, изоферменты 138

Элютриатр 168

Элютриация 168—172, 175

Эмбрион куринный, получение экстракта 218

Эмбриональная ткань, сравнение со взрослой тканью 14

Эмбриологическое часовое стекло 225.

См. также Техника часового стекла

Эмульсия, радиоавтография 313

Эозин, определение целостности мембраны 270

Эпителиальные клетки, рост на цитодексе 92

Эритрозин В, целостность мембраны 270

Эстераза D 138

Эстеразы, перекрестное заражение культур 141

Эритролейкоз 179

Этанол, фиксация клеточной суспензии 201

Ядро, окрашивание 202

Яйца куриные, тест на вирусное загрязнение культуры 135

ОГЛАВЛЕНИЕ

От переводчика	5
Предисловие	7
Список авторов	8
Список сокращений	9
Глава 1. Введение. Принципы стерильной работы и ведение клеток в культуре. Р. Фрешни	10
1. Введение	10
2. Биология клеток в культуре	10
2.1. Происхождение и характеристика	10
2.2. Дифференцировка	12
3. Выбор материала	13
3.1. Органная культура или культура клеток?	13
3.2. Источник ткани	14
3.3. Субкультивирование	16
3.4. Выбор среды	17
3.5. Газовая фаза	19
3.6. Субстрат	19
4. Подготовка	20
4.1. Субстрат	20
4.2. Среда	21
4.3. Клетки	22
Литература	25
Глава 2. Разработка химически-определенных бессывороточных сред для клеток млекопитающих. Г. Маурер	27
1. Введение	27
2. Роль сыворотки при культивировании клеток	27
2.1. Роль компонентов сыворотки	27
2.2. Возможные преимущества использования бессывороточных сред и сред с низким содержанием сыворотки	40

2.3. Некоторые недостатки использования сыворотки при культивировании клеток	40
2.4. Возможные недостатки использования бессывороточных сред	41
2.5. Для чего нужна бессывороточная среда?	41
3. Замена сыворотки в среде	42
3.1. Общий подход	42
3.2. Факторы, рассматриваемые перед выбором среды	42
4. Практические советы для выбора среды и работы с ней	48
4.1. Общие правила и предостережения	48
4.2. Стратегии оптимизации сред	49
5. Коммерческие препараты сред для оптимизации условий роста клеток млекопитающих	51
6. Методы покрытия поверхности культуральной посуды бноматриком	52
6.1. Покрытие поверхности культуральной посуды поли-D-лизинном	52
6.2. Выделение коллагена и покрытие поверхности культуральной посуды	53
6.3. Покрытие поверхности культуральной посуды фибронектином	53
Литература	54
Глава 3. Нарращивание клеток животных в культуре. Б. Гриффитс	56
1. Введение	56
2. Общие методы и параметры культур	57
2.1. Определение количества клеток	57
2.2. Оборудование и реагенты	58
2.3. Практические советы	61
2.4. Кинетика роста	62
2.5. Среда и питательные вещества	63
2.6. pH	65
2.7. Кислород	67
2.8. Типы культуральных систем	72
3. Монослойные культуры	74
3.1. Введение	74
3.2. Прикрепление клеток	76
3.3. Нарращивание клеток; этап 1, вращающиеся бутылки	78
3.4. Нарращивание клеток; этап 2, модификации вращающихся бутылей	79
3.5. Нарращивание клеток; этап 3, стационарные культуры большой емкости	81
3.6. Нарращивание клеток; этап 4, системы ферментёров	83
3.7. Заключение	94
4. Суспензионные культуры	94
4.1. Адаптация к суспензионной культуре	94
4.2. Статические суспензионные культуры	96
4.3. Небольшие суспензионные культуры	97
4.4. Факторы, определяющие процесс наращивания клеток	97
4.5. Ферментёры с перемешиванием	100
4.6. Проточные культуры	102
4.7. Ферментёр с эрлифтом	105
4.8. Инкапсулированные клетки	105
Литература	107
Глава 4. Сохранение и оценка качества клеток. Р. Хэй	108
1. Введение	108
2. Создание банка линий клеток	108

3. Замораживание клеток и оценка выхода	110
3.1. Оборудование	111
3.2. Подготовка и замораживание	114
3.3. Размораживание и оценка выхода клеток	115
4. Определение качества клеточных линий	118
4.1. Контроль	118
4.2. Тесты на микробное заражение	126
4.3. Тесты на заражение клеточных культур клетками другого вида	137
4.4. Идентификация тканей, из которых получены линии клеток	147
4.5. Идентификация и количественная оценка иммунологических продуктов	155
5. Банки данных о происхождении клеток	162
5.1. Банк данных по гибридомам CODATA-IUIS	163
5.2. MIRDB	163
6. Благодарности	164
Литература	164

Глава 5. Разделение жизнеспособных клеток элютриацией. Д. Конки 166

1. Введение	166
2. Методы разделения клеток	166
3. Элютриатор	168
3.1. Элютриаторный ротор	168
3.2. Элютриационная камера	170
3.3. Перистальтический насос и дополнительная аппаратура	171
3.4. Полная система элютриации	172
4. Технический протокол	173
4.1. Стерилизация аппаратуры	173
4.2. Калибровка скорости тока	174
4.3. Загрузка образца	174
4.4. Элютриация дискретных клеточных популяций	175
5. Сбор клеток и интерпретация данных	177
5.1. Гетерогенные клеточные популяции (достижение чистоты клеточных фракций)	177
5.2. Постоянные линии клеток (выход и жизнеспособность)	177
6. Дальнейшие перспективы	180
7. Благодарности	180
Литература	180

Глава 6. Проточная цитометрия. Л. Мораска и Э. Эрба 182

1. Введение	182
2. Сборка оборудования	183
2.1. Ortho Diagnostic Systems Inc. Ортоцитофлуорограф 11S (Ortho Cytofluorograf)	184
2.2. Клеточный сортер с активируемой флуоресценцией FACS 440 фирмы Becton Dickinson	189
3. Вывод данных	194
3.1. Описательные цитограммы	195
3.2. Гистограммы	195
3.3. Компьютерный анализ данных	195
4. Подготовка образцов	197
4.1. Суспензии клеток из различных тканей	197
5. Примеры типов исследований	201
5.1. Светорассеяние неокрашенных клеток	201
5.2. Процедура окрашивания	202
5.3. Применение процедур окрашивания	206
5.4. Метод флуоресцентных антител с использованием флуоресценции	208

6. Обсуждение	209
7. Благодарности	211
Литература	211
Глава 7. Органная культура. И. Ласнитски	214
1. Введение	214
2. Обзор техники органной культуры	214
2.1. Использование в качестве субстрата сгустка плазмы	215
2.2. Использование агара в качестве субстрата	215
2.3. Методы плотика	216
2.4. Метод сеток	216
2.5. Чередование культивирования эксплантатов в среде и газовой фазе	217
3. Техника часовых стекол	217
3.1. Получение эмбрионального экстракта	218
3.2. Получение куриной плазмы	219
3.3. Получение эксплантатов	219
4. Техника одиночного предметного стекла (метод Максимова)	223
4.1. Материалы	223
4.2. Приготовление культуры	223
4.3. Смена среды	224
5. Техника агарового геля	225
5.1. Техника эмбриологических часовых стекол	225
6. Культура эмбрионов для тератологических исследований	228
6.1. Получение эксплантатов	228
6.2. Газовая смесь	229
6.3. Среда	229
6.4. Схема эксплантации	229
7. Техника сеток	230
7.1. Материалы	231
7.2. Получение эксплантатов	233
7.3. Среда	235
7.4. Эксплантация	235
7.5. Инкубация и перфузия	236
7.6. Смена среды	237
8. Длительное культивирование взрослых тканей человека	238
8.1. Эксплантация и культивирование	239
8.2. Среда	239
8.3. Инкубация	240
8.4. Смена среды	242
9. Подготовка органных культур для световой микроскопии	242
9.1. Материалы	242
9.2. Фиксация и обезвоживание препаратов	242
9.3. Методы окрашивания	243
10. Радиоавтография	248
10.1. Обработка мечеными препаратами	249
10.2. Фиксация	249
10.3. Обезвоживание и заключение	249
10.4. Процедура заливки	249
11. Количественная оценка результатов	252
12. Преимущества и недостатки органной культуры	253
Литература	254
Глава 8. Тесты на цитотоксичность и жизнеспособность. Э. Вилсон	256
1. Введение	256
2. Общие сведения	257
3. Специфические методы	258
3.1. Методы культивирования	259

4. Концентрации лекарственных веществ	264
5. Продолжительность воздействия лекарственного препарата	265
6. Восстановительный период	268
7. Конечный результат	268
7.1. Цитотоксичность, жизнеспособность и выживаемость	268
7.2. Цитотоксичность и жизнеспособность	269
7.3. Выживаемость (репродуктивная целостность)	273
8. Сравнение систем исследования	276
9. Технические советы	276
9.1. Лекарственные препараты и их растворы	276
9.2. Инкубация с лекарствами	280
9.3. Тесты, основанные на определении выживаемости и пролиферативной способности	280
9.4. Методы определения цитотоксичности	287
10. Интерпретация результатов	294
10.1. Взаимосвязь между количеством клеток и индексом цитотоксичности	294
10.2. Кривые зависимости полученных результатов от концентрации	294
11. Трудности метода и их преодоление	297
11.1. Большое среднее квадратичное отклонение	298
11.2. Различия между опытами	298
11.3. Стимуляция выше контрольного уровня	298
11.4. Сравнение цитотоксичности и противоопухолевой активности	300
12. Автоматизация	300
13. Дальнейшие перспективы	301
Литература	302

Глава 9. Локализация с помощью радиоавтографии специфических последовательностей клеточных РНК, гибридизованных *in situ* с мечеными тритием зондами. Д. Конки

304

1. Введение	304
1.1. Принцип	304
1.2. Преимущества гибридизации <i>in situ</i>	304
2. Основные требования	305
2.1. Избыточность последовательности	305
2.2. Чистота зондов	305
2.3. Удельная активность зондов	306
2.4. Чувствительность	306
2.5. Усиление сигнала	307
2.6. Эффективность радиоавтографии	308
3. Подготовка реагентов и материалы	308
3.1. Материалы	308
3.2. Основные реагенты	308
3.3. Реагенты для гибридизации	309
3.4. Радиоавтография	309
4. Подробный протокол. Гибридизация <i>in situ</i>	309
4.1. Гибридизация <i>in situ</i>	309
5. Радиоавтография	311
5.1. Радиоавтография с пленкой Кодак AR-10	312
5.2. Окрашивание радиоавтографов с пленкой	312
5.3. Радиоавтография с жидкой эмульсией	313
5.4. Окраска радиоавтографов, покрытых жидкой эмульсией	313
6. Выявление молекулярных гибридов на цитологических препаратах с помощью методов, не использующих радиоактивную метку	314

7. Благодарности	315
Литература	315
Приложение	316
Общие реагенты	316
Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный)	316
Фосфатный солевой буфер в модификации Дюльбекко раствор А (ФСБА без Ca^{2+} и Mg^{2+})	316
Сбалансированный солевой раствор для препарирования	317
ФСБА/ЭДТА	317
Трипси	317
Предметный указатель	318

Научное издание

Д. Конки, Э. Эрба, Р. Фрешни и др.

**КУЛЬТУРА ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК.
МЕТОДЫ**

Под ред. Р. Айэн Фрешни

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев
Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова. Спец. редактор А. С. Серпинская
Ст. науч. редактор М. Р. Погосбекова
Мл. редактор М. С. Карнюшина. Художник А. А. Захаров
Художественные редакторы А. Я. Мусин, Л. М. Аленичева
Технические редакторы И. П. Гаврилина, Т. А. Мирошина. Корректор В. С. Соко

ИБ № 6633

Сдано в набор 28.VII—88. Подписано к печати 8.XII—88. Формат 60×90^{1/16}.

Бумага типографская № 1. Печать высокая. Гарнитура обыкновенная.

Объем 10,5 бум. л. Усл. печ. л. 21. Усл. кр.-отт. 21. Уч.-изд. л. 21,71.

Изд. № 4/5781. Тираж 6000 экз. Зак. 437. Цена 2 р. 70 к.

Издательство «МИР» В/О «Совэкспорткнига»

Государственного комитета СССР по делам
издательств, полиграфии и книжной торговли.
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.